



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2016

**Marta Manuela
Dâmaso**

**Estudo lipidómico da inflamação em modelos
in vitro e no lúpus eritematoso sistémico**

A lipidomic study of inflammation using *in vitro* models and systemic lupus erythematosus



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2016

**Marta Manuela
Dâmaso**

**Estudo lipidómico da inflamação em modelos
in vitro e no lúpus eritematoso sistémico**

A lipidomic study of inflammation using *in vitro* models and systemic lupus erythematosus

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização em métodos biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da FCT, da União Europeia, QREN, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE).

Apoio financeiro à unidade de investigação QOPNA (projeto PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296).



Dedico esta tese aos meus pais e irmã
pelo apoio incondicional.

O júri

presidente

Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora Auxiliar do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de
Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Manuel Silva Oliveira

Professora Auxiliar do Departamento de Química da
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço aos meus orientadores Doutor Pedro Domingues e Doutora Maria do Rosário Domingues por todo o tempo dispensado, por todos os ensinamentos transmitidos e por, sobretudo, me terem transmitido um gosto especial pela espetrometria de massa. Obrigada por terem tornado este ano de dissertação tão especial.

A todo o grupo de espetrometria de massa, a todas as meninas que partilharam o laboratório comigo e que tornaram os meus dias de laboratório mais felizes, um enorme obrigada. Agradeço em especial à Tânia por toda a paciência, humildade e carinho transmitidos ao longo deste ano. Espero um dia conseguir ser uma profissional tão completa como tu.

Obrigada a todos os meus amigos que partilharam esta jornada comigo. A ti Catarina, não existem palavras que consigam descrever todo o teu contributo ao longo destes anos. Pelo companheirismo, momentos de depressão e momentos de sucesso vividos sempre lado a lado, um obrigada do tamanho da tua beleza interior e exterior. Ao Daniel, ao Rafa e à Tina, que o nosso caminho se cruze sempre e que sejamos sempre tão felizes como fomos ao longo deste percurso. Ao Tó por ter feito questão de iniciar esta jornada comigo, por ter estado lá em todos os momentos e por fazer ainda mais questão de viver os meus sucessos. Obrigada a todos de coração.

Aos meus pais por me terem sempre permitido viver e lutar pelos meus sonhos, por celebrarem todas as conquistas, por serem a minha tranquilidade e por me mostrarem em todos os regressos que vale sempre a pena. Quando for grande quero ser como vocês. À minha irmã um obrigada especial por ser a minha maior companheira de viagem, pelos momentos que fazemos questão de viver juntas e por ser uma das minhas maiores fontes de inspiração.

A todos, um enorme e sincero obrigada.

Palavras-chave

Células monócitos THP-1, espectrometria de massa, fosfolípidos, inflamação, lipidômica, lúpus eritematoso sistêmico, perfil lipídico.

Resumo

A inflamação é um processo indispensável para permitir o retorno à homeostasia dos tecidos após uma determinada lesão. Os processos inflamatórios encontram-se associados a várias condições de doença, sendo um dos principais fatores associados à morbidade e mortalidade das patologias. Por sua vez, os fosfolípidos têm sido cada vez mais associados a processos inflamatórios, pelo que alterações no seu perfil poderão estar relacionados com alterações no processo inflamatório. Assim, o objetivo geral deste trabalho centrou-se na identificação e quantificação de alterações no perfil de fosfolípidos induzido pela inflamação em modelos *in vivo*, no lúpus eritematoso sistêmico, e em modelos *in vitro*, em células de monócitos THP-1, através de uma abordagem lipidômica.

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença autoimune de natureza inflamatória marcada por fases de remissão e recaída. Contudo, ainda não existe um meio de diagnóstico eficiente de forma a prever atempadamente o ciclo desta doença. Os extratos lipídicos de plasma foram analisados por TLC, observando-se diferenças significativas nas classes de fosfolípidos PC, LPC e PS. A análise dos ácidos gordos por GC-MS demonstrou alterações significativas nos ácidos gordos C16:0 e C22:6. Pela análise estatística multivariada e discriminante aplicada aos resultados obtidos por HPLC-MS e MS/MS observaram-se diferenças significativas nas classes PC, LPC e PE. Desta forma, estas classes sofrem alterações significativas de acordo com a fase em que a patologia se encontra, fase de remissão ou fase de recaída. A abordagem lipidômica permitiu, assim, distinguir entre os dois fenótipos da doença, sendo estes caracterizados por alterações nas classes de fosfolípidos mencionadas.

Para avaliar as adaptações à resposta inflamatória *in vitro* recorre-se a linhas celulares de células do sistema imune, como os macrófagos ou monócitos. Estas células foram tratadas com LPS, um indutor de stresse inflamatório, e com tunicamicina, um indutor do stresse do retículo endoplasmático. Por TLC observaram-se alterações significativas nas classes de fosfolípidos PE e PG, e pela análise de ácidos gordos observaram-se diferenças significativas nos ácidos gordos C16:1-cis, C18:0, C20:2 e C22:6. Por sua vez, a análise estatística multivariada e discriminante dos resultados obtidos pela técnica de HPLC/MS e MS/MS permitiu verificar que as classes PC, PI, PE e PS são aquelas que mais contribuem para a distinção entre os dois tipos de stresse. Assim, a metodologia aplicada permitiu verificar que o perfil lipídico das células se altera consoante a natureza do estímulo inflamatório.

Concluindo, a abordagem lipidómica aplicada neste trabalho demonstrou ser eficaz na análise e identificação das classes de fosfolípidos das condições estudadas, sendo possível distinguir entre cada uma das condições em ambos os estudos realizados. Assim, o estudo lipidómico permitiu uma melhor compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos no processo inflamatório do lúpus e das células. Este facto poderá ser utilizado como forma de diagnóstico e tratamento, permitindo atuar antes do agravamento dos sintomas associados aos processos inflamatórios.

Keywords

Inflammation, lipidomic, lipid profile, mass spectrometry, phospholipid, systemic lupus erythematosus, THP-1 monocyte cells.

Abstract

Inflammation is a crucial process for the defense mechanisms of the host against injuries. Inflammatory processes are associated with various disease condition and are one of the main factors associated with diseases morbidity and mortality. In turn, the phospholipids have been increasingly associated with inflammatory processes, so that changes in the phospholipid profile can be related to changes in the inflammatory process. Thus, the aim of this work has focused on the identification and quantitation of changes in phospholipids profile induced by inflammation in *in vivo* models, systemic lupus erythematosus and in *in vitro* models, THP-1 monocyte cells through a lipidomic approach.

Systemic lupus erythematosus is an autoimmune disease characterized by remission and relapse phases, however there is still no effective means of diagnosis to timely predict the appearance of the phases. The lipid extracts from plasma were analysed using TLC and showed significant differences in PC, LPC and PS. GC-MS technique was used to assess changes in the fatty acid profile, and showed significant changes in C16:0 and C22:6 fatty acids. The multivariate and discriminant statistical tests applied to the results obtained by HPLC-MS and MS/MS showed significant differences in the PC, LPC and PE. Thus, these phospholipid classes suffer significant changes according to the pathology state, remission or relapse phase. The lipidomics approach allowed to distinguish between the two phenotypes of the disease, which are characterized by changes in the phospholipid profile.

In vitro models using cell lines of immune cells such as macrophages or monocytes are frequently used to evaluate the changes in cell phenotype and metabolic pathways in response to the inflammatory stimuli. THP-1 monocytes cells treated with LPS and tunicamycin showed significant changes in phospholipid classes PE and PG using TLC. The GC-MS technique showed differences in the fatty acids C16:1-cis, C18:0, C20:2 and C22:6. In turn, the multivariate and discriminant analysis of the results obtained by HPLC/MS and MS/MS showed that PC, PI, PE and PS are the phospholipid classes that contribute the most to the distinction between the two types of stress. Thus, the applied methodology has shown that the cells lipid profile is altered depending on the nature of the inflammatory stimulus.

In conclusion, the lipidomics approach applied in this study proved to be suitable for the analysis and identification of phospholipid classes of the studied conditions studied, once it is possible to distinguish between each of the conditions in both studies. Thus, the lipidomic approach allowed a better understanding of the pathophysiological processes involved in

the inflammatory process of lupus and cells. This may be used as diagnosis and treatment, allowing to act before the symptoms aggravation associated with inflammatory processes.

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	v
Abreviaturas	vii
Capítulo 1	11
Introdução	1
1. Processo inflamatório das doenças autoimunes, um modelo <i>in vivo</i> de inflamação.....	1
1.1. Lúpus eritematoso sistémico.....	2
2. Inflamação em modelos <i>in vitro</i>	6
2.1. O papel do stresse do retículo induzido pela tunicamicina na inflamação	6
2.2. O papel do lipopolissacarídeo na inflamação.....	11
3. O papel da lipidómica na análise e quantificação de lípidos.....	14
4. Objetivo.....	16
Capítulo 2.....	23
2. Materiais e métodos	21
2.1. Reagentes	21
2.2. Cultura de células	21
2.3. Extração de fosfolípidos das células THP-1 através do método de <i>Blight and Dyer</i>	22
2.3. Extração de fosfolípidos do plasma de doentes com lúpus na fase de remissão e recaída utilizando a técnica de extração em fase sólida	22
2.4. Quantificação dos fosfolípidos através do ensaio da quantificação de fósforo	23
2.5. Separação das classes de fosfolípidos por cromatografia de camada fina (TLC)	24
2.6. Análise e quantificação de ácidos gordos por GC-MS.....	25
2.7. Análise e quantificação das classes de fosfolípidos por HPLC-MS.....	26
2.8. Análise estatística	27
Capítulo 3.....	22
3. Avaliação das alterações no perfil lipídico em amostras de plasma de doentes com SLE ativo e inativo por espetrometria de massa.....	31
3.1. Resultados	31
3.2. Discussão.....	53
3.3. Conclusão	57
Capítulo 4.....	60
4. Avaliação das alterações no perfil lipídico de células de monócitos THP-1 tratadas com LPS e Tunicamicina	62
4.1. Resultados	62
4.2. Discussão.....	85
4.3. Conclusão	90

Capítulo 5.....	92
5. Conclusão e Perspetivas Futuras	94
Capítulo 6.....	97
6. Referências.....	99

Índice de Figuras

Figura 1- Distribuição por género das principais doenças autoimunes. Os números da parte superior das barras referem-se ao número total dos casos de doenças (*1,000,000) nos Estados Unidos da América (adaptado de (7,8)).	1
Figura 2- Principais mecanismos e respostas envolvidos no stresse do retículo endoplasmático (baseado em (33)).	9
Figura 3- Principais vias de sinalização do LPS dependentes do MyD88 e dependentes do TRIF (baseado em (55)).	12
Figura 4- Estrutura geral de um glicerofosfolípido.	15
Figura 5 -Separação das classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico de amostras de plasma de doentes com SLE em fase de recaída (SLE ativo), fase de remissão (SLE inativo) e sem doença (controlo) através de TLC. As classes de fosfolípidos foram identificadas por comparação com padrões de fosfolípidos aplicados e devidamente identificados na placa de TLC: lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomiéline (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) e ácido fosfatídico (PA).	32
Figura 6- Percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos identificadas no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controlo), de pacientes com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo). As classes de fosfolípidos foram separadas por TLC e a percentagem relativa de cada classe determinada pela quantificação espectral de fósforo. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão de três amostras independentes (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.	33
Figura 7- Percentagem relativa de ácidos gordos presentes no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controlo), com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo). O perfil dos ácidos gordos foi obtido pela análise do cromatograma e espectros de massa de GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão de três amostras independentes (n=3). * $p < 0,05$.	34
Figura 8- Representação gráfica das pontuações de PCA (componente principal 1 (Função 1) versus componente principal 2 (Função 2)) obtidas pela análise multivariada dos extratos lipídicos das condições sem doença (controlo), com SLE em fase de remissão (inativo) e com SLE em fase de recaída (ativo). Esta representação considera as classes de fosfolípidos identificadas pela técnica de HPLC-MS no modo negativo.	40
Figura 9- Representação gráfica das pontuações de PCA (componente principal 1 (Função 1) versus componente principal 2 (Função 2)) obtidas pela análise multivariada dos extratos lipídicos das condições sem doença (controlo), com SLE em fase de remissão (inativo) e com SLE em fase de recaída (ativo). Esta representação considera as classes de fosfolípidos identificadas pela técnica de HPLC-MS no modo positivo.	41
Figura 10- Percentagem relativa de fosfolípidos da classe PC presentes no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controlo), com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo) após a análise por HPLC-MS no modo negativo como iões $[M+CH_3COO]^-$. Identificação das espécies moleculares de PC com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.	45

Figura 11- Percentagem relativa de fosfolípidos da classe PC presentes no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controle), com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo) após a análise por HPLC-MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$. Identificação das espécies moleculares de PC com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. .48

Figura 12- Abundância relativa de fosfolípidos da classe LPC presentes no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controle), com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo) após a análise por HPLC-MS no modo negativo como iões $[M+CH_3COO]^-$. Identificação das espécies moleculares de LPC com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. .50

Figura 13- Abundância relativa de fosfolípidos da classe PE presentes no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controle), com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo) após a análise por HPLC-MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. Identificação das espécies moleculares de PE com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. .53

Figura 14- Separação das classes de fosfolípidos das células de monócitos THP-1 não tratadas (controle) e tratadas com indutores de stresse inflamatório (LPS) e de stresse do retículo endoplasmático (tunicamicina) por TLC. As classes fosfolipídicas foram identificadas pela aplicação de padrões de fosfolípidos puros na mesma placa de TLC.63

Figura 15- Percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos identificadas no extrato lipídico de amostras de células de monócitos THP-1 sem estímulo (controle) e tratadas com LPS e tunicamicina. As classes de fosfolípidos foram separadas por TLC e a percentagem relativa de cada classe determinada pela quantificação espectralométrica de fósforo. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão de três amostras independentes ($n=3$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$64

Figura 16- Percentagem relativa de ácidos gordos dos extratos lipídicos das células de monócitos THP-1 não tratadas (controle) e tratadas com LPS e tunicamicina. O perfil de ácidos gordos foi obtido pela análise dos cromatogramas e espectros de massa de GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão de três amostras independentes ($n=3$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$65

Figura 17- Representação gráfica das pontuações de PCA (componente principal 1 (Função 1) versus componente principal 2 (Função 2)) obtidas pela análise multivariada dos extratos lipídicos de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina. Esta representação considera as classes de fosfolípidos identificadas pela técnica de HPLC-MS/MS no modo negativo.71

Figura 18- Representação gráfica das pontuações de PCA (componente principal 1 (Função 1) versus componente principal 2 (Função 2)) obtidas pela análise multivariada dos extratos lipídicos de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina. Esta representação considera as classes de fosfolípidos identificadas pela técnica de HPLC-MS no modo positivo.72

Figura 19- Percentagem relativa de fosfolípidos da classe PC presentes no extrato lipídico de amostras de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina após análise dos espectros de HPLC-MS no modo negativo como iões $[M+CH_3COO]^-$. Identificação das espécies moleculares de PC com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise de estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$74

Figura 20- Abundância relativa de fosfolípidos da classe PC presentes no extrato lipídico de amostras de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina após análise dos espectros de HPLC-MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. Identificação das espécies moleculares de PC com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 77

Figura 21- Abundância relativa das espécies moleculares de fosfolípidos da classe PI presentes no extrato lipídico de amostras de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina após análise dos espectros de HPLC-MS no modo negativo como iões $[M-H]^-$. Identificação das espécies moleculares de PI com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$80

Figura 22- Abundância relativa das espécies moleculares de fosfolípidos da classe PS presentes no extrato lipídico de amostras de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina após análise dos espectros de HPLC-MS no modo negativo como iões $[M-H]^-$. Identificação das espécies moleculares de PS com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$83

Figura 23- Abundância relativa das espécies moleculares de fosfolípidos da classe PE presentes no extrato lipídico de amostras de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina após análise dos espectros de HPLC-MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. Identificação das espécies moleculares de PE com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$85

Índice de Tabelas

Tabela 1- Espécies moleculares de fosfolípidos que mostraram variação mais significativa para as três condições em estudo, controlo, SLE ativo e SLE inativo, respetivos rácios F e valor de p-value obtidos através da análise ANOVA aplicada aos dados obtidos por HPLC-MS no modo negativo e positivo. As espécies moleculares fosfolipídicas foram identificadas pela massa teórica do programa lipid maps. Designação dos fosfolípidos de acordo com o seu número de carbonos e insaturações (C:N).....36

Tabela 2- Grupos centróides obtidos pelas funções discriminantes canónicas formadas através da análise discriminante de Fisher dos dados obtidos por HPLC-MS no modo negativo.....39

Tabela 3- Grupos centróides obtidos pelas funções discriminantes canónicas formadas através da análise discriminante de Fisher dos dados obtidos por HPLC-MS no modo positivo.....39

Tabela 4- Estatística descritiva das espécies moleculares de PC identificadas por HPLC-MS/MS no modo negativo como iões $[M+CH_3COO]^-$ e classificadas através do teste ANOVA e post-hoc de Tukey.42

Tabela 5- Estatística descritiva das espécies moleculares de PC identificadas por HPLC-MS/MS no modo positivo sob a forma de iões $[M+H]^+$ e classificadas através do teste ANOVA e post-hoc de Tukey.46

Tabela 6- Estatística descritiva das espécies moleculares de LPC identificadas por HPLC-MS/MS no modo negativo sob a forma de iões $[M+CH_3COO]^-$ e classificadas através do teste ANOVA e post-hoc de Tukey.	49
Tabela 7- Estatística descritiva das espécies moleculares de PE identificadas por HPLC-MS/MS no modo positivo sob a forma de iões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ e classificadas através do teste ANOVA e post-hoc de Tukey.	51
Tabela 8- Espécies moleculares de fosfolípidos com maiores diferenças significativas entre as condições estudadas, respetivos rácios F e valor de p-value obtidos através da análise ANOVA aplicada aos dados obtidos por HPLC-MS/MS no modo negativo e positivo. As espécies moleculares foram identificadas através da massa teórica do lipid maps. Designação dos fosfolípidos de acordo com o seu número de carbonos e insaturações (C:N).	66
Tabela 9- Grupos centróides das funções discriminantes canónicas formadas através da análise discriminante de Fisher dos dados obtidos por HPLC-MS no modo negativo.....	69
Tabela 10- Grupos centróides obtidos pelas funções discriminantes canónicas formadas através da análise discriminante de Fisher dos dados obtidos por HPLC-MS no modo positivo.	70
Tabela 11- Estatística descritiva das espécies moleculares de PC identificadas por HPLC-MS/MS no modo negativo sob a forma de iões $[M+CH_3COO]^-$ e classificadas através do teste ANOVA e post-hoc de Tukey.	73
Tabela 12- Estatística descritiva das espécies moleculares de PC identificadas por HPLC-MS/MS no modo positivo sob a forma de iões $[M+H]^+$ e classificadas através do teste ANOVA e post-hoc de Tukey.	75
Tabela 13- Estatística descritiva das espécies moleculares de PI identificadas por HPLC-MS/MS no modo negativo sob a forma de iões $[M-H]^-$ e classificadas através do teste ANOVA e post-hoc de Tukey.	78
Tabela 14- Estatística descritiva das espécies moleculares de PS identificadas por HPLC-MS/MS no modo negativo sob a forma de iões $[M-H]^-$ e classificadas através do teste ANOVA e post-hoc de Tukey.	81
Tabela 15- Estatística descritiva das espécies moleculares de PI identificadas por HPLC-MS/MS no modo positivo sob a forma de iões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ e classificadas através do teste ANOVA e post-hoc de Tukey.	84

Abreviaturas

ANOVA	Análise de variância com um fator
ACN	Acetonitrilo
AF	Ácido fórmico
Anti-dsDNA	Anticorpos anti-DNA de cadeia dupla
APC	Célula apresentadora de antígenos
ARE	Elementos de resposta antioxidante
ATF6	Fator ativador da transcrição 6
BiP	Proteína de ligação à imunoglobulina
CCT	Citidiltransferase
CD14	<i>Cluster</i> de diferenciação 14
CDP-colina	Citidina difosfocolina
CDP-DAG	Citidina difosfatodiacilglicerol
CHOP	Fator de transcrição da proteína homóloga C/EBP
CL	Cardiolipina
CPT1	Colinafosfotransferase 1
CRE	Elementos de resposta do ATF/Camp
CREB	Proteína de ligação ao de elemento de resposta Camp
DHA	Ácido docosaheptaenóico
eIF2 α	Fator de iniciação eucariótico 2 α
ER	Retículo endoplasmático
ERK	Cinases reguladas por sinais extracelulares
ERSE-1	Elementos de resposta ao stresse do retículo endoplasmático
FoxO1	<i>Forhead box O1</i>
GADD34	Inibidor do crescimento e indutor de danos no DNA 34
GC-MS	<i>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa</i>
GSK3	Glicogénio sintase cinase 3
HDL	Lipoproteína de elevada densidade
HESI	Fonte de iões <i>electrospray</i> aquecida
HILIC-LC/MS	Cromatografia líquida de interação hidrofílica
HMGB1	proteínas do grupo 1 de mobilidade alta

HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa
IFN	Interferão
IL	Interleucina
IRAK	Cinase associada ao recetor da interleucina
IRE1 α	Enzima dependente de inositol 1 α
IUPAC	União Internacional da Química Aplicada
LBP	Proteína de ligação do LPS
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPS	Lipopolissacarídeo
MANOVA	Análise de variância multivariada
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogenes
MIF	Fator de inibição da migração de macrófagos
MS/MS	Espectrometria de <i>massa tandem</i>
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NRF2	Fator nuclear eritroide 2
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PC	Fosfatidilcolina
PCA	Análise dos componentes principais
PDIA6	Proteína dissulfido isomerase 6
PE	Fosfatidiletanolamina
PERK	Cinase do retículo endoplasmático semelhante à PKR
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PIP	Fosfatidilinositol fosforilada
PKR	Proteína cinase dependente do RNA de cadeia dupla
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PPAR	Recetor ativado por proliferadores de peroxissomas
PS	Fosfatidilserina
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SFK	Família de tirosinas cinases-Src

siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLE	Lúpus eritematoso sistémico
SLEDAI 2 k	<i>SLE Disease Activity Index 2000</i>
SM	Esfingomielina
SNP	Polimorfismos num único nucleótido
SPE	Extração em fase sólida
TGF	Fator de transformação do crescimento
TLC	Cromatografia em camada fina
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIF	Domínio TIR indutor do interferão β
UPR	Resposta das proteínas <i>unfolded</i>
XBP1	Proteína de ligação à x-box 1
β_2 -GPI	Glicoproteína β_2

Capítulo 1

Introdução

Introdução

1. Processo inflamatório das doenças autoimunes, um modelo *in vivo* de inflamação

As doenças autoimunes são doenças crônicas individualmente raras, mas que no seu conjunto afetam entre 3 a 5 % da população mundial (1). As doenças autoimunes são provocadas por uma disfunção no sistema imune em que este ataca os seus próprios órgãos, tecidos e células. As mulheres são o grupo mais afetado em qualquer uma das doenças autoimunes mais comuns (**Figura 1**). As causas exatas ainda são desconhecidas, sabendo-se apenas que o desenvolvimento da doença tem como base fatores genéticos e ambientais (2,3). A predisposição genética foi estudada recorrendo a gémeos monozigóticos, tendo-se verificado que esta predisposição é diferente para cada doença. No caso da artrite reumatoide a taxa ronda os 15 % (4), sendo de 57 % no caso do lúpus eritematoso sistémico (5). A comparação entre estas taxas e a incidência das doenças na população mundial permitiu concluir que a predisposição genética é o fator dominante para o desenvolvimento das doenças autoimunes (6). Os estudos populacionais demonstraram que cada população tem uma predisposição genética diferente. As mutações genéticas parecem ter um efeito quase nulo *per si*, mas em combinação com outros alelos podem promover ou proteger dos fenómenos autoimunes (3).

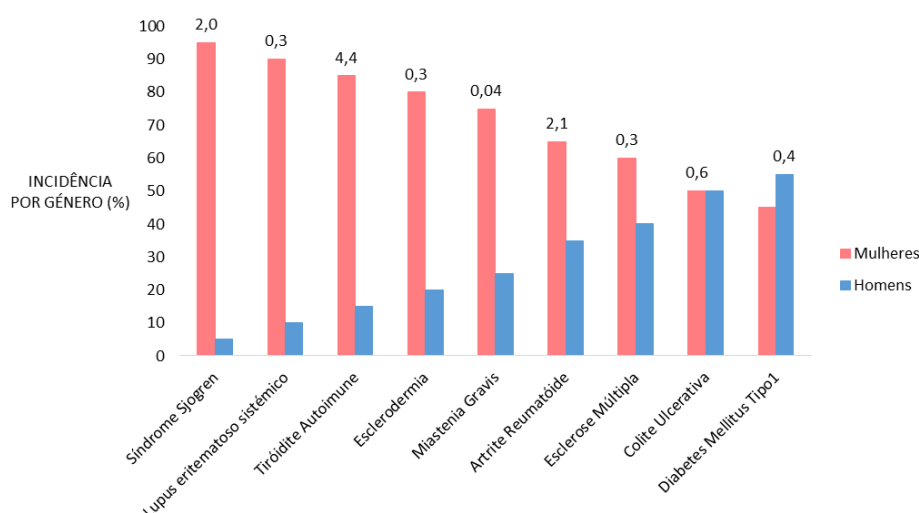


Figura 1- Distribuição por gênero das principais doenças autoimunes. Os números da parte superior das barras referem-se ao número total dos casos de doenças (*1,000,000) nos Estados Unidos da América (adaptado de (6,7)).

O lúpus eritematoso sistémico representa uma das doenças autoimunes com maior incidência ao nível da população mundial (6,7). Os mecanismos moleculares e os eventos biológicos associados às fases de remissão e recaída desta doença continuam pouco

conhecidos. Atualmente sabe-se que o perfil lipídico dos pacientes com SLE sofre alterações através dos eventos pró-inflamatórios, contudo ainda não existe qualquer estudo que relacione este perfil com cada um dos estádios da doença. Sendo assim, torna-se necessário entender as alterações no perfil lipídico de cada uma das fases da patologia e, conseqüentemente, entender o processo de sinalização subjacente.

1.1.Lúpus eritematoso sistêmico

O lúpus é uma doença autoimune caracterizada por um grupo de sintomas muito diversificados, em resultado do efeito da doença em vários órgãos (revisto em (8)). Esta doença divide-se em quatro tipos, lúpus eritematoso neonatal e pediátrico, lúpus eritematoso discoide, lúpus induzido por fármacos e, o mais comum, o lúpus eritematoso sistêmico (SLE). O SLE é normalmente denominado por “lúpus”, diferenciando-se dos outros tipos devido ao seu efeito simultâneo em vários órgãos. Este tipo de lúpus afeta maioritariamente mulheres em idade fértil, podendo também afetar a população em geral em qualquer faixa etária (9,10). As populações mais atingidas pelo SLE são a afro-americana, asiática, hispânica e americana. Nos últimos anos, a taxa de mortalidade tem vindo a diminuir devido ao diagnóstico precoce e aos progressos na terapêutica. A taxa de sobrevivência após 10 anos do diagnóstico ultrapassa os 90%, sendo 15 % superior do que há 30 anos atrás (11).

O SLE é uma doença autoimune inflamatória associada a fatores genéticos, epigenéticos e ambientais que provocam a disfunção das células T, células B e células dendríticas, e a produção de anticorpos antinucleares (12,13). A patogénese da SLE permanece desconhecida e a terapia baseia-se, essencialmente, em corticosteroides e fármacos citotóxicos anti-proliferativos. Esta terapia apresenta uma eficácia limitada e riscos de toxicidade associada. Um dos fatores associados ao aparecimento do SLE são os fatores genéticos (14). Os *genome wide associations studies* demonstraram que os genes mais associados ao SLE são os genes relacionados com a resposta imune, a inflamação, a aderência das células inflamatórias ao endotélio e a resposta dos tecidos à lesão. Relativamente aos fatores epigenéticos, o aparecimento do SLE pode estar associado à metilação do DNA e à modificação pós-traducional das histonas (15). Estes fatores epigenéticos podem ser de natureza hereditária ou modificados por fatores ambientais. A radiação ultravioleta, os fármacos desmetilantes e os vírus infecciosos ou endógenos são vistos como causas ambientais para o desenvolvimento do SLE (16). Todos estes fatores conduzem ao desenvolvimento da patologia através do

reconhecimento entre o linfócito T e a célula apresentadora de antígenos (APC) (17,18). O recetor do linfócito T liga-se ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da APC, levando à libertação de citocinas, inflamação e estimulação das células B. Este estímulo em conjunto com a produção de autoanticorpos da imunoglobulina G provocam a lesão dos tecidos, presente no SLE. Contrariamente ao que se verifica em indivíduos saudáveis, os autoanticorpos específicos das células T e B podem interagir, produzindo autoanticorpos lesivos. A maioria dos autoanticorpos identificados no SLE, os anticorpos antinucleares, marcam componentes do núcleo das células. A deteção dos anticorpos antinucleares é essencial para o diagnóstico do SLE, podendo verificar-se um resultado positivo para vários tipos de anticorpos antinucleares. Os anticorpos antinucleares mais associados ao SLE são os anticorpos anti-DNA de cadeia dupla (anti-dsDNA) (19).

A partir do momento em que o processo inflamatório é ativado, ocorre a produção de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias, tais como, interleucina (IL) 1, IL-6, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferões (IFN), fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) e proteínas do grupo 1 de mobilidade alta (HMGB1) (revisto em (20)). Contrariamente, verifica-se uma redução na produção de citocinas anti-inflamatórias, a IL-4, IL-10 e o fator de transformação do crescimento- β (TGF- β). O processo inflamatório leva também à produção de espécies reativas de oxigénio pelos monócitos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares (PMN), células T, células *Kupffer* e neuróglia. Este processo, em conjunto com o desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, é responsável pelas lesões nos órgãos e tecidos, observadas no SLE. Das *et al* (21) propuseram que a inflamação prolongada no SLE poderia estar relacionada com uma falha nos processos de resolução da inflamação. Assim, o equilíbrio entre a inflamação e a resolução da inflamação encontra-se alterado a favor dos eventos pró-inflamatórios.

O SLE é também uma doença marcada pela alteração do perfil lipídico, associado à aterosclerose e ao risco aumentado de desenvolver enfarte do miocárdio (22). Na população geral, elevadas concentrações da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triacilgliceróis, e baixas concentrações da lipoproteína de elevada densidade (HDL) representam elevados fatores de risco independentes para desenvolver doenças cardiovasculares (23). Em pacientes com SLE, o perfil lipídico encontra-se também alterado. Nestes pacientes observa-se a presença de concentrações aumentadas de triacilgliceróis e concentrações diminuídas de colesterol HDL, associados a eventos de

enfarte do miocárdio. Kobayashi *et al* (24) verificaram que moléculas de colesterol LDL oxidadas (oxLDL) formam complexos estáveis com a glicoproteína β_2 (β_2 -GPI) (24). Estes complexos estão, por sua vez, associados a eventos de trombose arterial. Os anticorpos anti- β_2 -GPI, presentes no soro de pacientes com SLE, ligam-se a um complexo formado pela β_2 -GPI e glicerofosfolípidos carregados negativamente, tais como, cardiolipina, fosfatidilserina e ácido fosfatídico. A presença de um fragmento composto por 14 resíduos de aminoácidos carregados positivamente e de um *loop* flexível no domínio V da β_2 -GPI permite a interação entre o complexo e a fosfatidilserina, o ácido fosfatídico e a cardiolipina. A dieta e hereditariedade são os dois fatores mais determinantes para as variações das concentrações lipídicas plasmáticas, no entanto o papel da inflamação ainda é pouco conhecido. Em modelos animais foi possível constatar que uma alteração nos níveis do TNF- α estão associados ao aumento de colesterol no soro e à diminuição dos níveis do colesterol HDL (25). De facto, em pacientes com SLE, o TNF- α relaciona-se com baixos níveis de colesterol HDL e elevados níveis de triacilgliceróis (26). No entanto, o TNF- α está também associado à resistência à insulina, estando esta diminuída em indivíduos com SLE. A diminuição da resistência à insulina, segundo os autores (26), está relacionada com alterações no nível de colesterol nestes pacientes. Assim, existe pouca informação que relacione a inflamação e o perfil lipídico de pacientes com SLE, independente de outros fatores, como a medicação e a sensibilidade à insulina.

Relativamente ao diagnóstico do SLE, este pode ser baseado na medição dos anticorpos antinucleares e da análise do desempenho dos mecanismos inflamatórios e anti-inflamatórios (27). Nesta doença, verifica-se que uma diminuição na urina dos níveis do mediador lipídico anti-inflamatório lipoxina A₄ são acompanhados por um aumento dos níveis dos mediadores pró-inflamatório leucotrieno (LT). A progressão e as lesões verificadas no SLE durante a fase de recaída são caracterizadas pela diminuição da produção da lipoxina A₄ e do aumento da produção de LT pelo tecido renal e/ou pela infiltração de leucócitos e macrófagos (21). O desequilíbrio é possivelmente provocado por um défice na produção de moléculas a favor da resolução da inflamação, levando a uma resolução deficiente do processo inflamatório. Este facto conduz a um atraso na reparação do processo e a uma lesão permanente dos tecidos e órgãos. Isto explica o facto de os pacientes continuarem a sofrer lesões associadas ao SLE, mesmo quando já são alvo dos tratamentos baseados em fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores. Das *et al*

(21) concluíram que o tratamento para o SLE deve centrar-se na administração de moléculas anti-inflamatórias e a favor da resolução da inflamação, tais como, lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas. Estes mediadores são formados com o intuito de restabelecer a homeostasia dos tecidos. Após a lesão, os eicosanóides, como as prostaglandinas e LT, ativam e amplificam a inflamação aguda. Através da resposta vascular, os leucócitos migram para o local lesionado e as prostaglandinas E₂ e I₂, envolvidas na vasodilatação, e o LTB₄, envolvido na quimiotaxia e adesão, estimulam a migração de neutrófilos para os tecidos lesionados. A resolução da inflamação inicia-se através das prostaglandinas D₂ e E₂ que ativam a expressão de enzimas-chave necessárias para iniciar a síntese gradual de mediadores lipídicos com atividade não só anti-inflamatória, mas também a favor da resolução da inflamação. Este processo é denominado por *lipid mediator class switching* e permite a inibição da resposta inflamatória aguda. Entre os mediadores anti-inflamatórios encontram-se as lipoxinas, resultantes do ácido araquidónico, as resolvinas, protectinas e maresinas, resultantes de ácidos gordos de ómega-3. As lipoxinas e as resolvinas estimulam o recrutamento de monócitos não flogísticos, permitindo que os macrófagos removam os neutrófilos apoptóticos, num processo conhecido por esferocitose. O processo de resolução da inflamação permite, assim, recuperar a homeostasia dos tecidos

Como foi possível constatar, o SLE é uma doença caracterizada por uma elevada heterogeneidade a nível das manifestações clínicas e por fases alternadas de recaída e de remissão (14). O diagnóstico da patologia baseia-se na medição laboratorial dos anticorpos antinucleares e da avaliação do desempenho dos mecanismos lipídicos. Estes métodos possibilitam apenas o diagnóstico da patologia, não permitindo prever de forma precisa a fase em que a doença se encontra. Este facto impossibilita a previsão antecipada dos eventos de remissão e recaída, de modo a poder intervir terapêuticamente e contrariar o efeito de agravamento dos sintomas. Estas fases de recaída e remissão são marcadas por desequilíbrios ao nível dos mecanismos inflamatórios. Ainda pouco se sabe acerca das alterações lipídicas provocadas pela inflamação presente em doentes com SLE, existindo apenas informação relativa às alterações dos níveis de colesterol associada à inflamação (23). Assim, este estudo representa o primeiro estudo que se debruça na análise e quantificação dos glicerofosfolípidos nas diferentes fases da doença. Estes podem ser uma das estratégias no auxílio do diagnóstico e prognóstico, podendo mesmo servir para avaliar a eficácia da terapêutica.

2. Inflamação em modelos *in vitro*

De modo a compreender os processos inflamatórios e as vias alteradas, recorre-se, com frequência, a modelos *in vitro* utilizando linhas celulares de células do sistema imune. As células THP-1 são uma linha celular de leucemia humana aguda monocítica que apresenta semelhanças na morfologia e diferenciação com os macrófagos humanos (revisto em (28)). As células THP-1 possuem várias vantagens relativamente às células de macrófagos humanos. As células de monócitos THP-1 possuem uma informação genética homogénea que minimiza a variabilidade no fenótipo celular. Nestas células a modificação genética através de *small interfering RNA* (siRNA), com o intuito de regular negativamente a expressão de uma proteína específica é bastante facilitada. A nível do armazenamento, estas células podem ser mantidas indefinidamente em azoto líquido. Sendo assim, estas células são amplamente utilizadas para o estudo *in vitro* de patologias e processos inflamatórios. Neste tipo de estudos *in vitro* recorre-se com frequência ao estímulo de células por lipopolissacarídeos, como estímulo pró-inflamatório. Sabe-se, contudo, que o stresse do retículo endoplasmático se encontra também associado ao stresse oxidativo e à inflamação, pelo que diversos compostos são comumente utilizados para induzir este tipo de stresse em células do sistema imune em modelos *in vitro* de inflamação.

2.1.O papel do stresse do retículo induzido pela tunicamicina na inflamação

A tunicamicina é um antibiótico, associado à ativação do stresse do retículo endoplasmático (ER) (29). O ER está dinamicamente organizado numa rede tubular envolvida em processos metabólicos, como a gluconeogénese e a síntese de lípidos. Este organelo é também o maior reservatório celular de cálcio, contribuindo também para a biogénese de autofagossomas e peroxissomas. No ER ocorrem os primeiros passos da maturação de proteínas, sendo estes cruciais para o *folding* correto de proteínas que são sintetizadas nas vias secretoras. A maquinaria para o *folding* das proteínas é particularmente posta à prova nas células secretoras especializadas, devido ao seu papel importante na síntese de proteínas, que representa uma fonte constante de stresse. A eficiência do *folding* das proteínas é alvo de vários ajustes em resposta a estímulos ambientais e celulares através de mecanismos de *feedback*. Estes mecanismos de *feedback* reprogramam a expressão de genes em condições de stresse do retículo.

O stresse do ER é caracterizado pela ativação celular de mecanismos complementares adaptativos que tentam compensar as alterações no *folding* das proteínas (30). Estes

mecanismos, no seu conjunto, são conhecidos como a resposta das proteínas *unfolded* (UPR). A UPR realiza a tradução da informação do estado de *folding* das proteínas do lúmen do ER para o núcleo e o citosol, de modo a neutralizar as flutuações na carga das proteínas *unfolded*. Em condições de stresse do ER, a ativação da UPR reduz a carga das proteínas *unfolded* através de vários mecanismos de sobrevivência celular. Entre estes mecanismos encontram-se a expansão da membrana do ER, com aumento da expressão de lípidos, síntese seletiva de componentes chave do *folding* das proteínas e da maquinaria de controlo de qualidade, e atenuação da entrada de proteínas no ER (31). Quando o stresse do ER não é eliminado e a homeostasia não é restaurada, a UPR ativa a apoptose. A UPR é mediada pela ação de três proteínas de sinalização, denominadas enzima dependente de inositol 1 α (IRE1 α , do inglês *inositol-requiring protein-1 α*), cinase do retículo endoplasmático semelhante à PKR (PERK, do inglês *protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*) e fator ativador da transcrição 6 (ATF6, do inglês *activating transcription factor 6*) (**Figura 2**). Na ausência de stresse, as proteínas PERK e ATF6 encontram-se num estado inativo complexadas com a proteína de ligação à imunoglobulina (BiP, do inglês *Binding Immunoglobulin Protein*), uma *chaperone* residente no ER. A partir do momento em que as proteínas *unfolded* se acumulam no ER, a BiP liberta-se das proteínas PERK e ATF6, para se associar às proteínas *unfolded* (32). Para ocorrer a ativação da IRE1 α , as proteínas *unfolded* ligam-se diretamente à proteína mencionada. De um modo geral, a partir do momento em que a IRE1 α , a PERK e a ATF6 são ativadas, estas induzem os eventos de tradução de sinal, que permitem diminuir a acumulação de proteínas *unfolded* no ER. Esta ação é levada a cabo através do aumento da expressão das *chaperones* do ER, inibindo a entrada de proteínas no organelo e estimulando o transporte de proteínas *missfolded* do ER para o citosol. Assim, inicia-se a ubiquitinação e destruição das proteínas *missfolded* por um processo denominado degradação assistida do ER (ERAD).

A proteína IRE1 α é uma molécula chave, responsável pelo destino das células. A IRE1 α é uma proteína transmembranar constituída por um domínio do lúmen N-terminal, um domínio transmembranar e um efetor citosólico C-terminal (revisto em (29)). Esta estrutura é responsável pelas suas funções como proteína cinase e endorribonuclease. Gardner *et al* (33) demonstraram que, em modelos *in vivo*, a IRE1 α atua ligando-se diretamente às proteínas *unfolded* através do seu domínio do lúmen do ER. Em modelos *in vitro*, a IRE1 α liga-se a péptidos constituídos por resíduos básicos e hidrofóbicos (33). Estes autores demonstraram que, neste caso, a BiP não é fundamental para mediar a UPR.

Em vez disso, a BiP atua como uma molécula reguladora do tempo atuação da IRE1 α , participando na sua inativação a partir do momento em que a homeostasia é reestabelecida. A acumulação de proteínas *unfolded* no ER induz a oligomerização da IRE1 α na membrana do ER e a autofosforilação do domínio citosólico da proteína (34). Estes eventos levam à ativação do domínio citosólico de RNAase. A IRE1 α ativada processa o mRNA que codifica para o fator de transcrição da proteína de ligação à x-box 1 (XBP1). A variante de *frameshift splice* formada (sXBP1) sofre translocação para o núcleo, de modo a induzir a *upregulation* dos seus genes alvo. Estes genes são responsáveis pelo evento de ERAD, pela entrada de proteínas no ER e pelo *folding* de proteínas. Além disso, o XBP1 regula também a síntese de fosfolípidos necessária para a expansão do ER em condições de stresse.

A proteína ATF6 é um fator de transcrição que durante o stresse do retículo se move para o complexo de Golgi, onde é clivada pela ação de duas proteases (35). A protease S1P cliva a ATF6 no domínio luminal, sendo a porção N-terminal clivada, posteriormente, pela S2P. O domínio N-terminal citosólico clivado (ATF6f) movimenta-se para o núcleo, ligando-se aos elementos de resposta do ATF/Camp (CRE) e aos elementos de resposta do stresse do ER (ERSE-1). Esta ligação ativa genes alvo, tais como, BiP, Grp94 e CHOP, responsáveis pelo controlo de genes que codificam para os componentes da ERAD e para o XBP1. Num estudo realizado em modelos de isquémia/reperfusão, foi possível verificar que a proteína ATF6 protege os cardiomiócitos pela indução da expressão do gene da proteína dissulfido isomerase 6 (PDIA6) (36). Esta, por sua vez, codifica para uma enzima do retículo que catalisa a formação da ligação dissulfureto nas proteínas e que auxilia, assim, no *folding* de proteínas no lúmen do ER.

Relativamente à proteína PERK, esta é a principal responsável por atenuar a tradução do mRNA em condições de stresse, prevenindo a entrada de proteínas recém sintetizadas no ER sob stresse (37). Esta atenuação da tradução é mediada pela fosforilação e, consequente inativação, do fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2 α), inibindo a tradução da maioria das proteínas, com subsequente indução do bloqueio do ciclo celular na fase G1. O crescimento celular é, assim, inibido, de modo a evitar fontes adicionais de stresse do ER. No entanto, a fosforilação do eIF2 α permite também a tradução preferencial dos genes dependentes da UPR, tais como, o fator ativador da transcrição 4 (ATF4). O ATF4 tem como genes alvo o fator de transcrição da proteína homóloga C/EBP (CHOP), o inibidor de crescimento e indutor de danos no DNA 34 (GADD34) e o ATF3. Além do

eIF2 α , a proteína PERK pode também fosforilar o fator nuclear eritroide 2 (NRF2), contribuindo para a dissociação do complexo NRF2-Keap1 e para a expressão de genes que possuem elementos de resposta antioxidante (ARE). Este mecanismo previne o stresse oxidativo.

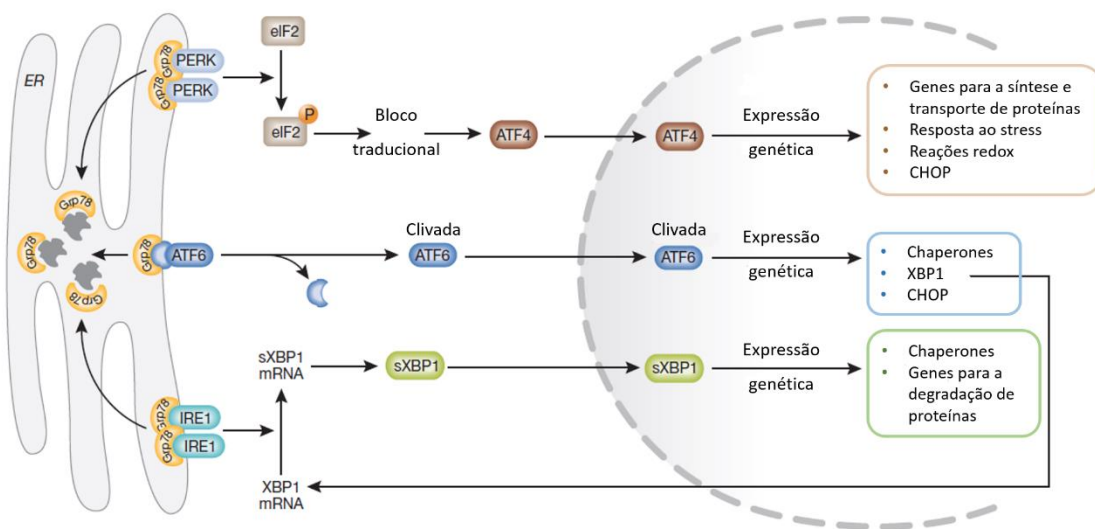


Figura 2- Principais mecanismos e respostas envolvidos no stresse do retículo endoplasmático (baseado em (33)).

O stresse do ER encontra-se intimamente ligado aos mecanismos envolvidos na inflamação e no sistema imune. A proteína IRE1 α pode ser fosforilada por sinais provenientes dos *Toll-like receptors* (TLR), de modo a induzir o *splicing* do mRNA do fator XBP1 e auxiliar na produção de citocinas pró-inflamatórias nos macrófagos (38). Martino *et al* (38) verificaram que a ativação do XBP1 pelo IRE1 é necessária para promover a produção de mediadores inflamatórios, incluindo a IL-6. Esta via de ativação da IRE1 e da XBP1 pelo TLR demonstrou ser independente do stresse do ER, não contribuindo para a indução dos genes ativados por este tipo de stresse. A acumulação de proteínas *unfolded* encontra-se associada a varias doenças autoimunes, incluindo a doença inflamatória do intestino, esclerose múltipla e artrite reumatoide (39). Kaser *et al* (40) evidenciaram que a deleção do XBP1 nas células epiteliais do intestino, resulta na inflamação espontânea do intestino delgado e em respostas exacerbadas das células epiteliais do intestino aos indutores da doença inflamatória do intestino, ao TNF- α e flagelina. Este fenótipo foi atribuído à incapacidade das células epiteliais do intestino deficientes em XBP1 expressarem atividade antimicrobiana e responderem corretamente a sinais inflamatórios. Além disso, estes investigadores identificaram também vários polimorfismos num único nucleótido (SNP) no *locus* do gene XBP1, o que confere um

elevado risco para as duas formas da doença inflamatória do intestino. A proteína cinase dependente do RNA de cadeia dupla (PKR) está associada à identificação do RNA viral durante a resposta do sistema imune inato. A PKR foi também relacionada ao stresse do ER (41). Quando a PKR é ativada, tal como a PERK, fosforila o fator eIF2 α , levando à inativação da síntese de proteínas e à inibição da replicação de vírus.

Nos últimos anos, evidências indicam que o stresse do ER se encontra associado ao metabolismo lipídico de uma forma bidirecional (42). A ativação das vias de stresse do ER pode conduzir à lipogénese e à alteração da homeostasia lipídica e, por sua vez, os lípidos e o metabolismo aberrante de lípidos podem induzir o stresse do ER. Os ácidos gordos saturados, como o ácido palmítico e o ácido esteárico, possuem a capacidade de induzir o stresse do ER em vários tipos de células, podendo também modular os sinais de sobrevivência e de apoptose celular (43). Fu *et al* (44) analisaram amostras de fígado de ratos obesos e saudáveis, recorrendo à proteómica e lipidómica (44). Os resultados demonstraram que no proteoma de ratos obesos ocorre um aumento da presença de enzimas metabólicas envolvidas no metabolismo lipídico e a *downregulation* de genes associados à síntese de proteínas do ER. O grupo de investigação afirmou, assim, que o ER das células do fígado de ratos obesos sofre uma alteração, deixando de ser o local principal para a síntese de proteínas, e passando a ser o principal responsável pela síntese de lípidos e pelas funções do metabolismo lipídico. Além disso, verifica-se um aumento dos ácidos gordos saturados incorporados nos lípidos do ER do fígado, relativamente aos ácidos gordos derivados de ómega-3 e 6. Este estudo (44) revelou ainda que no fígado de ratos obesos ocorre o aumento do nível de fosfatidilcolina, comparativamente à fosfatidiletanolamina, sendo estes fosfolípidos abundantes no ER. O aumento do rácio fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina induziu alterações no transporte de cálcio, levando a uma retenção deficiente de cálcio no ER. O cálcio é um componente fundamental para a homeostasia do ER e para o funcionamento das *chaperones*. Assim, alterações nos níveis de cálcio estão associadas ao *missfolding* de proteínas e ao stresse do ER. Um dos mecanismos para repor o *folding* eficiente das proteínas e a homeostasia consiste no aumento do volume do ER (45). Neste mecanismo corre a sobre expressão do fator de transcrição XBP1, levando à expansão de retículo endoplasmático através do aumento da síntese de fosfatidilcolina. No entanto, o conhecimento detalhado sobre o efeito do ER no perfil lipídico é ainda escasso, pelo que será objeto do nosso trabalho de mestrado.

2.2.O papel do lipopolissacarídeo na inflamação

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula ubíqua presente em bactérias Gram-negativas e reconhecido pelas células do sistema imune do ser humano (revisto em (46)). O LPS é frequentemente usado como estímulo pró-inflamatório em estudos *in vitro*. Esta molécula é um composto carregado negativamente constituído por uma componente lipofílica altamente preservada, o lípido A, e polissacarídeos ou oligossacarídeos ligados ao seu domínio ancorado na membrana. A porção de sacarídeo possui um comprimento e composição variável entre as bactérias Gram-negativa. A parede celular das bactérias Gram negativa é uma estrutura assimétrica (47). O LPS pode ser encontrado em mais de 90 % da parede celular, enquanto que os fosfolípidos que estão localizados no folheto interno possuem uma composição semelhante às dos fosfolípidos da membrana interna citoplasmática. Esta estrutura única membranar funciona como uma barreira física, protegendo as bactérias de agentes antibacterianos. Tal facto foi comprovado, uma vez que alguns péptidos antimicrobianos são ativados perante uma determinada estirpe bacteriana, não sendo ativados perante outras, apesar destas bactérias terem uma membrana interna com um conteúdo fosfolipídico semelhante (48). Esta diferença de resposta perante as estirpes de bactérias é explicada pela diferente composição em LPS de cada uma das estirpes.

O primeiro evento da resposta imune ao LPS ocorre no exterior das células (49). O LPS liga-se à proteína de ligação ao LPS (LBP), que circula no sistema sanguíneo, sendo este complexo reconhecido pelo TLR4. O TLR4 atua em conjunto com o MD-2 e o *cluster* de diferenciação 14 (CD14). A partir do momento em que o complexo LPS-LPB é reconhecido, a cascata de sinalização do TLR4 pode iniciar-se. Esta cascata pode ser dependente do MyD88 ou independente do MyD88. A porção intracelular do TLR4 possui um domínio *Toll/IL-1R*, que permite a sua interação com a família de proteínas e moléculas adaptadoras MyD88 e com o adaptador de proteína que contém o domínio TIR indutor do interferão β (TRIF). O TLR4 é um fator único, uma vez que exerce a sua função através de ambas as vias de sinalização do MyD88 e do TRIF, não estando limitado exclusivamente às vias dependentes do MyD88 ou do TRIF, como os outros TLRs. Após o TLR4 recrutar o MyD88, ocorre a ativação de uma cascata de sinalização que envolve a cinase associada ao recetor da IL (IRAK) (50). Esta família é constituída por quatro elementos, sendo o IRAK-1, -2 e -4 associados à tradução do sinal. Por sua vez, o IRAK-3 atua de forma a inibir a via de sinalização do TLR. A via do TLR4

dependente do MyD88 é finalizada pela ativação da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) e do fator nuclear κ B (NF- κ B). Pela ativação destes dois fatores ocorre, conseqüentemente, a transcrição de genes pró-inflamatórios (**Figura 3**).

A via de sinalização do TRIF requer a endocitose do TLR4 (49). Por sua vez, esta endocitose recruta o CD14, levando a interferências na interação do complexo CD14-TLR4-LBP e impedindo a passagem bem sucedida do TLR4 para o meio interno. Watanabe *et al* (51) demonstraram que a via de sinalização dependente do TRIF pode ser ativada sem a presença do CD14 (51). Contudo, este mecanismo necessita que o LPS seja diretamente entregue ao interior da célula, demonstrando, assim, que a via dependente do TRIF requer a sinalização do TLR4 no conteúdo membranar citoplasmático. Após a ativação do TRIF, este induz o fator regulador do IFN β , prosseguindo a sinalização através da fosfatidilinositol-3-fosfato cinase (PI3K) (49). O IFN β é, finalmente, ativado, assim como os genes anti-inflamatórios (**Figura 3**). Deste modo, a via ativada pelo LPS dependente do TRIF, apresenta efeitos protetores. Estes efeitos podem ser observados relativamente à isquemia resultante da lesão associada ao enfarte (52) e através do facto de a deleção do TRIF induzir a dermatite alérgica exacerbada em ratos (53). Os resultados apontam, assim, para o efeito anti-inflamatório da via de sinalização dependente da TRIF.

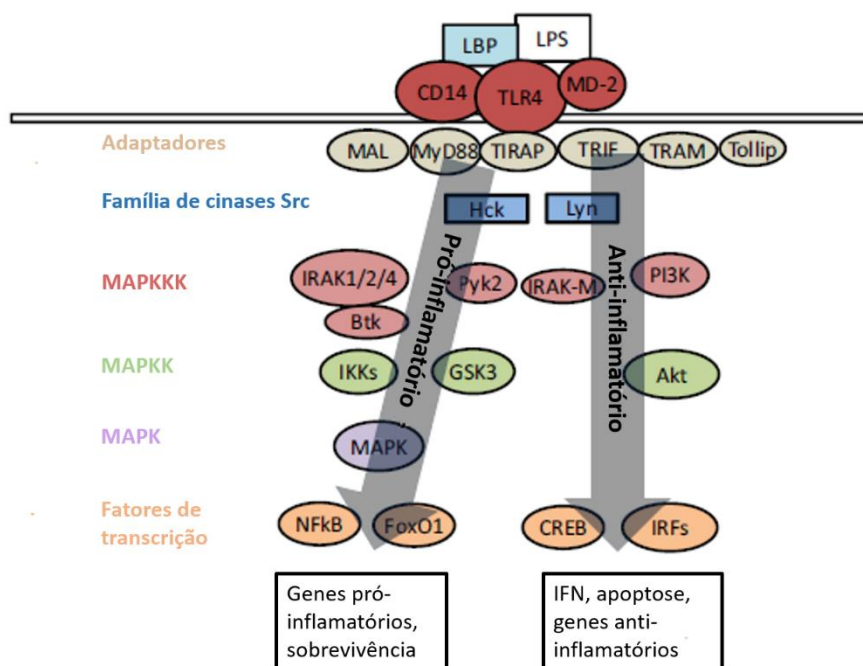


Figura 3- Principais vias de sinalização do LPS dependentes do MyD88 e dependentes do TRIF (baseado em (55)).

Inicialmente, os estudos indicavam que as vias dependentes do MyD88 e as vias dependentes do TRIF atuavam de forma isolada. Contudo, evidências indicam que existe uma ligação entre as duas vias durante o stresse inflamatório. A família de tirosinas cinases-Src (SFK) atuam na via dependente do MyD88, sendo ativadas pelo fator associado ao recetor do TNF6 (TRAF6) (54). A SFK Lyn, um membro da família SFK, ativa, por sua vez, a PI3K. A maioria dos estudos aponta para o facto de a SFK e a PI3K serem os principais mediadores das vias de sinalização do TLR4 dependente do MyD88 e dependente do TRIF (54,55). Relativamente à diferença entre o fenótipo pró e anti-inflamatório em resposta ao LPS, esta é regulada por uma rede competitiva (47). Nesta rede é possível encontrar as moléculas anti-inflamatórias PI3K, Akt e a proteína de ligação ao elemento de resposta Camp (CREB), em oposição às moléculas pró-inflamatórias a glicogénio sintase cinase 3 (GSK3) e à *forhead box O1* (FoxO1). A PI3K diminui a ativação do NF- κ B através da fosfoinositídeo-dependente cinase 1, levando à inibição da atividade do TRAF6 e à ativação induzida pelo LPS da Akt e das cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) (56). De uma forma geral, a PI3K regula o TLR, atuando de forma a neutralizar os dois principais fatores responsáveis pela transcrição de genes pró-inflamatórios, o NF- κ B e a MAPK. Por sua vez, a Akt é um mediador dos efeitos anti-inflamatórios da PI3K, através da inibição da FoxO1 e ativação da CREB (57). O GSK3 encontra-se relacionado com várias vias inflamatórias (58). Esta molécula pró-inflamatória inibe a indução do IFN β pelo LPS, possuindo um papel inibidor da via de sinalização dependente do TRIF.

Os lípidos são constituintes essenciais das células, sendo responsáveis por funções celulares, que regulam vários processos biológicos (59). As membranas são constituídas na sua grande maioria por lípidos e proteínas. Uma alteração no conteúdo proteico e lipídico ou na interação entre estas duas moléculas, pode induzir alterações ao nível da fluidez membranar. As modificações na estrutura da bicamada fosfolipídica regulam, possivelmente, a atividade enzimática, os canais membranares e o transporte de proteínas, contudo ainda pouco se sabe acerca dos mecanismos envolvidos. Diversos estudos *in vitro*, utilizando LPS como molécula pró-inflamatória, mostraram que este estímulo induz alterações no perfil lipídico em células do sistema imune, nomeadamente, em células dendríticas (60) e em queratinócitos (61). Nas células dendríticas foi possível verificar que durante o processo de maturação ocorre um aumento das classes de fosfolípidos fosfatidilcolina e ceramida e uma diminuição das classes esfingomiélinina e

fosfatidilinositol (60). Este estudo (60) demonstrou também que durante a maturação das células dendríticas, estimuladas com LPS, a ceramida aparenta ter um papel fundamental para que esta maturação ocorra. Assim, a ocorrência de uma via mediada pela ceramida pode estar relacionada com algumas alterações funcionais observadas durante o processo de maturação das células. Relativamente aos queratinócitos, foi possível verificar que o estímulo destas células com LPS induz alterações nas classes de fosfolípidos fosfatidilcolina e fosfatidilserina (61). Segundo estes autores (61), a abordagem lipidómica utilizada ao longo deste trabalho permitiu identificar as espécies moleculares de fosfolípidos envolvidas nos processos inflamatórios da pele. Assim, é possível afirmar que a lipidómica é uma técnica adequada para o estudo dos processos metabólicos e funções celulares envolvidos em sistemas biológicos.

3. O papel da lipidómica na análise e quantificação de lípidos

Os fosfolípidos são os principais constituintes das membranas biológicas, sendo responsáveis pela modelação do tráfego membranar (62). Os metabolitos derivados da degradação dos fosfolípidos são importantes moléculas de sinalização celular, envolvidas em processos de proliferação e apoptose. Existem várias classes de fosfolípidos com diferentes grupos de cabeça polar e uma grande variedade de espécies moleculares em cada classe. Estas espécies moleculares são constituídas por diferentes combinações de ácidos gordos nas posições *sn*-1 e *sn*-2 (**Figura 4**). A identificação e quantificação destas espécies moleculares é essencial para a compreensão das vias de sinalização celulares, uma vez que a composição em fosfolípidos da membrana celular contribui para as suas propriedades bioquímicas e biofísicas. Os fosfolípidos são estudados funcional, qualitativa e quantitativamente através de abordagens lipidómicas, permitindo, assim, o estudo dos fosfolípidos como potenciais biomarcadores de inúmeras patologias (63). A lipidómica é uma metodologia que reúne a extração dos lípidos, a cromatografia com o intuito de fracionar cada uma das classes moleculares e, por fim, a análise por espetrometria de massa, de modo a detetar e determinar a estrutura lipídica. A espetrometria de massa (MS) é uma técnica sensível, específica, seletiva e rápida, sendo a técnica ideal para a análise de fosfolípidos (64). O espetrómetro de massa é constituído por uma fonte de iões, um analisador de massa e um detetor de iões. De uma forma geral, as moléculas do analito são transformadas em iões em fase gasosa na fonte de iões, sendo, posteriormente, separados no analisador de massa, de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). Por fim, são detetados pelo detetor de iões, levando à formação de um espectro de

massa da abundância relativa de cada íon em função do valor de m/z . Adicionalmente, é possível obter o padrão de fragmentação de cada espécie observada através da espectrometria de massa *tandem* (MS/MS). Este padrão de fragmentação é muito importante na identificação inequívoca das espécies observadas. Por exemplo, o espectro de MS/MS dos fosfolípidos possui muito frequentemente informação relativa ao grupo de cabeça polar e à composição em ácidos gordos, permitindo a identificação da estrutura e classe de fosfolípidos.

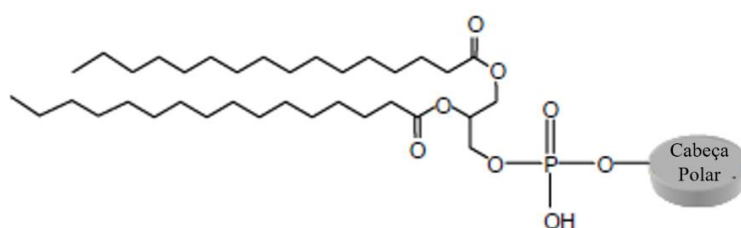


Figura 4- Estrutura geral de um glicerofosfolípido.

O primeiro passo de qualquer análise de fosfolípidos consiste no isolamento destas moléculas dos tecidos através da extração com solventes orgânicos e remoção dos componentes não lipídicos dos extratos (revisto em (65)). O método de *Bligh and Dyer* é o método mais adequado para a extração de fosfolípidos, consistindo numa mistura de clorofórmio/metanol (1:2) (66). Os fosfolípidos ficam retidos na fase inferior constituída por clorofórmio. A inativação das enzimas e a máxima recuperação do conteúdo lipídico deve ser sempre tida em consideração. A extração dos lípidos deve ser realizada a baixas temperaturas (4 °C), de modo a evitar a oxidação dos ácidos gordos polinsaturados e a hidrólise dos lípidos. A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de extração também utilizada, tendo como objetivo a purificação da amostra biológica e diminuição dos efeitos da matriz que poderiam impedir a ionização dos analitos de interesse. (67). De modo a obter o fracionamento das classes de fosfolípidos, recorre-se, frequentemente, à cromatografia de camada fina (TLC) (63). Esta técnica consiste numa camada fina de fase estacionária, como a sílica. O TLC não é uma técnica muito sensível, contudo permite um fracionamento e identificação rápidos das classes de fosfolípidos. A análise dos ácidos gordos dos fosfolípidos é realizada através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) (68). Um dos requisitos desta técnica baseia-se na capacidade dos lípidos entrarem na fase gasosa do cromatógrafo sem alterarem a sua estrutura molecular. Os lípidos possuem uma natureza, normalmente, não volátil, sendo necessária a derivatização química. Assim, o ácido carboxílico dos ácidos gordos deve

ser convertido em metil-, etil- ou propilestéres. A separação cromatográfica de alta eficiência (HPLC) e a caracterização por espectrometria de massa (MS) são as técnicas mais utilizadas para a separação dos lípidos, de acordo com as suas propriedades físicas, e para a identificação precisa das suas classes e espécies moleculares, com base nos iões produto característicos (69). Assim, a técnica de HPLC-MS/MS é a técnica com maior capacidade para realizar a quantificação de um elevado número de analitos, necessária para o estudo das funções biológicas dos fosfolípidos. Esta técnica não necessita de derivatização, levando a uma diminuição do tempo e custos associados.

De uma forma geral, a metodologia utilizada na abordagem lipidómica, baseia-se na extração dos compostos pretendidos através de solventes orgânicos, seguida de fracionamento por TLC e de análise e quantificação por GC-MS e HPLC-MS/MS. Esta metodologia possibilita, assim, analisar e quantificar de forma precisa os fosfolípidos em sistemas biológicos. Deste modo, torna-se possível entender não só o papel dos fosfolípidos em condições biológicas e patológicas, como também entender os mecanismos moleculares inerentes às alterações no processo inflamatório. Este facto permitirá prever de forma precisa a fase da inflamação em que as doenças se encontram e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e farmacológicas relativas às doenças.

4. Objetivo

A inflamação é um processo que se encontra associado a várias condições de doença, sendo um dos principais fatores associados à morbilidade e mortalidade das patologias. Assim, neste trabalho pretende-se avaliar o perfil lipídico em modelos *in vivo*, no lúpus eritematoso sistémico, e em modelos *in vitro*, em células de monócitos THP-1. O lúpus eritematoso sistémico é uma das doenças autoimunes mais comuns a nível mundial. Tal como todas as doenças autoimunes, o lúpus eritematoso sistémico é caracterizado por uma alteração no sistema imune em que este ataca os seus próprios órgãos, tecidos e células. Esta doença é marcada por episódios de progressão e regressão, associadas a fases de recaída e remissão, respetivamente. Estas fases de recaída e remissão são marcadas por desequilíbrios ao nível dos mecanismos inflamatórios. Os fosfolípidos têm sido cada vez mais associados a processos inflamatórios, pelo que alterações no seu perfil poderão estar associados aos dois fenótipos da doença.

Assim, um dos objetivos propostos para este trabalho reside na identificação e quantificação dos fosfolípidos no plasma de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em fase de recaída e em fase de remissão, utilizando uma abordagem lipidômica. Nesta abordagem, a utilização da espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida surge como a técnica mais apropriada para a análise do perfil lipídico de amostras biológicas. Os resultados obtidos irão permitir entender as alterações no perfil lipídico durante as fases de recaída e remissão e, conseqüentemente, entender o processo de sinalização subjacente. Deste modo, poderá ser possível desenvolver meios de diagnóstico que permitam prever atempadamente as fases de remissão desta patologia.

A resposta ao stresse do retículo endoplasmático constitui um processo celular que é ativado através de uma variedade de estímulos que altera o *folding* das proteínas no ER. As células eucarióticas desenvolveram um mecanismo adaptativo conservado, a resposta das proteínas *unfolded*, que permite retirar as proteínas *unfolded* e restaurar a homeostasia do ER. O stresse do ER induz disfunções ao nível celular, podendo inclusive induzir a morte celular, estando estes fatores associados a inúmeros processos patológicos. Por sua vez, o lipopolissacarídeo, é uma molécula de reconhecimento padrão, envolvida nas respostas do sistema imune a um determinado estímulo e associado a processos pró e anti-inflamatórios. A importância, tanto do stresse do retículo como do stresse inflamatório induzido pelo lipopolissacarídeo, na modelação do metabolismo lipídico representa um tema ainda pouco explorado.

Assim, o segundo objetivo deste trabalho reside na identificação e quantificação das alterações no perfil de fosfolípidos em células de monócitos THP-1 sob stresse do retículo induzido pelo fármaco tunicamicina e sob stresse inflamatório induzido pelo lipopolissacarídeo, utilizando uma abordagem lipidômica. Esta abordagem permitirá conhecer os mecanismos envolvidos no processo inflamatório e entender as diferenças entre os estímulos inflamatórios e do stresse do retículo endoplasmático.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes

O meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI) foi adquirido na *Sigma-Aldrich Chemical Co* (S. Louis, MO, EUA). Os padrões de fosfolípidos 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inositol) (PI 16:0/16:0), 1-nonadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC 19:0), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (PC 14:0/14:0), 1,2-ditetradecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (PE 14:0/14:0), 1,2-ditetradecanoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol) (PG 14:0/14:0), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (PS 14:0/14:0) foram obtidos da Avanti® Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL, EUA) e usados sem qualquer purificação adicional. A primulina, o LPS e a tunicamicina foram obtidos da *Sigma-Aldrich Chemical Co* (S. Louis, MO, EUA), a trietilamina e o hidróxido de potássio foram adquiridos da *Merck* (Darmstadt, Alemanha) e o ácido perclórico da *Panreac* (Barcelona, Espanha). O acetonitrilo (ACN), clorofórmio (CHCl_3), metanol (MeOH), o ácido fórmico (AF) e o hexano, adquiridos da *Fisher Scientific* (Leicestershire, UK), possuem um grau de pureza adequado para o HPLC e foram usados sem qualquer purificação adicional.

2.2. Cultura de células

A linha celular de monócitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202, American Tissue Culture Collection, Manassas, VA) foi cultivada num meio RPMI 1640 suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal de bovino não inativado, 25 mM de glucose, 10 mM de tampão HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,05 mM de 2-mercaptoetanol. As células foram plaqueadas numa densidade entre $0,2 \times 10^6$ e 1×10^6 células/mL, tendo-se realizado a subcultura a cada 2-3 dias. As células foram mantidas em cultura por um período máximo de 2 meses. Após o cultivo das células, colocaram-se 40×10^6 células por frascos (3 frascos) em meio RPMI (50 mL) sem soro. Seguidamente, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) ou Tunicamicina (2 µg/mL). Após 24 horas da estimulação, recolheram-se as células por centrifugação a 300 g durante 5 minutos para tubos de falcon de 50 mL. Ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de tampão fosfato salino e transferiu-se as células para *ependorfs* de 1,5 mL, sendo novamente centrifugados a 300 g durante 5 minutos. Rejeitou-se por completo o sobrenadante e armazenou-se o *pellet* a -80 °C, sendo posteriormente usado para o estudo do perfil lipídico de células sujeitas a diferentes condições de *stresse*.

2.3. Extração de fosfolípidos das células THP-1 através do método de *Blight and Dyer*

O extrato lipídico total do *pellet* celular correspondente a cada condição experimental foi obtido por recurso ao método de extração de *Blight and Dyer* (66). O *pellet* das células ($\sim 40 \times 10^6$ células) foi ressuspendido em 1 mL de H₂O Milli-Q e transferido para um novo tubo de vidro colocado em gelo. Adicionou-se 3,75 mL de uma solução de 1:2 (v/v) CHCl₃:MeOH e realizou-se um vortex vigoroso. Seguidamente, incubou-se em gelo durante 30 minutos. As amostras foram novamente agitadas num vórtex durante 30 segundos, procedendo-se à adição de 1,25 mL de CHCl₃ e 1,25 mL de H₂O. A solução foi novamente agitada num vortex durante 1 min após a adição de cada um dos solventes. De modo a separar a fase orgânica da fase aquosa, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente utilizando uma centrífuga Mixtasel (*Selecta*). A fase orgânica foi recolhida para um novo tubo de vidro. Posteriormente, adicionou-se 1,88 mL de CHCl₃ à fase aquosa, agitou-se vigorosamente num vórtex e realizou-se uma nova centrifugação durante 5 minutos a 1000 rpm. Recolheu-se a fase orgânica e adicionou-se à fase orgânica anterior, tendo-se evaporado o CHCl₃ na totalidade, em fluxo de azoto. As amostras foram dissolvidas em 600 µL de CHCl₃ e transferidas para *vials*. Estas foram novamente submetidas a um fluxo de azoto e armazenadas a -20 °C até posterior análise.

2.3. Extração de fosfolípidos do plasma de doentes com lúpus na fase de remissão e recaída utilizando a técnica de extração em fase sólida

De modo a estudar as diferenças no perfil fosfolipídico de doentes com SLE em fase de remissão e em fase de recaída, realizou-se a extração em fase sólida (SPE) de amostras de plasma sem doença (n=5), com doença em fase de remissão (n=5) e com doença em fase de recaída (n=5). As amostras de plasma foram recolhidas de pacientes da Clínica Lúpus, do Departamento de Reumatologia da Universidade de Coimbra. Estes pacientes foram recrutados, sendo-lhes retiradas amostras de sangue para este estudo. A severidade da doença foi identificada no momento da recolha, de acordo com o *SLE Disease Activity Index* 2000 (SLEDAI 2 k) (70). Os pacientes foram então divididos em dois grupos, SLE em fase de remissão (inativo) e SLE em fase de recaída (ativo). Inicialmente adicionou-se 5 µg de padrão interno PC (14:0/14:0) a cada 100 µL de amostra de plasma. Procedeu-se à precipitação das proteínas através da adição de 900 µL de ACN com AF a 1% a cada amostra, agitando-se num vórtex durante 30 segundos. De modo a obter a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos, tendo-se transferido

o sobrenadante para um novo tubo de vidro. A extração dos fosfolípidos para posterior análise lipídica ficou realizada através da extração em fase sólida recorrendo a um *Visiprep SPE Vacuum Manifold* (Supelco, Bellefonte, PA). Os cartuchos *Hybrid SPE-PL* (Thermo Scientific) foram lavados com 1 mL de ACN com AF a 1 % e 1 mL de ACN puro. A eluição dos fosfolípidos retidos nos cartuchos foi realizada através da adição de duas alíquotas consecutivas de 1 mL de ACN com hidróxido de amónio a 5 %. As amostras foram levadas à secura total através de uma corrente de azoto e armazenadas a -20 °C até posterior análise.

2.4. Quantificação dos fosfolípidos através do ensaio da quantificação de fósforo

Com o objetivo de determinar a quantidade total de fosfolípidos presentes no extrato lipídico das amostras de plasma (n=15) e de células THP-1 (n=3) realizou-se um ensaio de quantificação espectrofotométrica de fósforo de acordo com o método proposto por Barillet e Lewis (71), com algumas modificações. Este método foi também utilizado para comparar a quantidade existente em cada classe de fosfolípido fracionada por cromatografia de camada fina (TLC). As amostras de plasma e células previamente secas foram redissolvidas em 300 µL de CHCl₃. Transferiu-se 10 µL de cada amostra, em duplicado, para tubos de vidro e secou-se em um fluxo de azoto. Adicionou-se 10 µL de ácido perclórico a 70 % (m/v) a cada tubo e incubou-se durante 1 hora a 180 °C num bloco de aquecimento (*Stuart Block Heater SBH200D*). Os padrões internos com concentração variável entre 0,1 e 2 µg de fósforo foram preparados através de uma solução padrão de dihidrogenofosfato de sódio dihidratado com 100 µg/mL de fósforo. Estas soluções padrão foram submetidas ao mesmo tratamento que as amostras, com exceção do aquecimento no bloco. Seguidamente, adicionou-se a cada um dos tubos aproximadamente 825 µL de H₂O Milli-Q, 125 µL de molibdato de amónio 2,5 % (m/v) e 125 µL de ácido ascórbico 10 % (m/v). Após a adição de cada solvente aos tubos e incubou-se durante 10 minutos a 100 °C num banho de água (*Precistern P-Selecta*). No final do tempo mencionado, os tubos foram colocados em água fria para promover o arrefecimento.

Por fim, foram transferidos 200 µL de cada solução para uma microplaca de 96 poços, em duplicado, cuja leitura da absorvência foi realizada a 797 nm num leitor de microplacas *Multiskan GO* (Thermo Scientific). A quantidade de fósforo presente em cada amostra foi calculada por regressão linear através da representação gráfica da absorvência média dos duplicados de padrão interno (eixo Y) em função da quantidade de fósforo

presente em cada padrão (eixo X). No caso dos extratos lipídicos, a quantidade de fosfolípidos presente foi diretamente calculada pela multiplicação da quantidade de fósforo por 25.

2.5. Separação das classes de fosfolípidos por cromatografia de camada fina (TLC)

A separação das classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico das células (n=3) e do plasma (n=9) sujeitos a cada uma das condições experimentais foi realizada através de TLC utilizando placas de sílica gel 60 (*Merck*) com zona de concentração 2,5x20 cm. Previamente à separação, as placas de sílica foram lavadas numa câmara contendo uma solução de CHCl_3 (1:1, v/v), seguida de secagem na *hotte* durante 15 minutos. Seguidamente, borrifou-se a placa de sílica com uma solução de ácido bórico em etanol 2,3 % (m/v) e colocou-se numa estufa a 100 °C durante 15 minutos. Após o arrefecimento da placa, aplicaram-se os extratos lipídicos. Aplicaram-se 30 μL do extrato lipídico, correspondentes a 30 μg de fosfolípidos (solução inicial com concentração de 150 μg de fosfolípido por 100 μL de solução). No caso dos extratos lipídicos de plasma foram realizados triplicados biológicos de cada condição experimental (controlo, SLE em remissão e SLE em recaída). Relativamente ao extrato lipídico das células foram realizados duplicados de cada condição (controlo, LPS e tunicamicina). A fim de identificar as classes de fosfolípidos presentes nas amostras, aplicou-se 10 μL de uma mistura de padrões em 3 *spots* da placa, em particular, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e ceramida; esfingomielina, fosfatidilserina e cardiolipina; fosfatidilinositol e ácido fosfatídico. Secaram-se os *spots* através de uma corrente de azoto e eluíram-se os fosfolípidos aplicados na placa de sílica numa câmara contendo um eluente composto por uma mistura de solventes de clorofórmio/etanol/ H_2O Milli Q/trietilamina em proporção 30:35:7:35 (v/v/v/v). Após a eluição completa, a placa foi deixada na *hotte* até a evaporação completa do eluente. A revelação dos *spots* foi conseguida pela pulverização da placa com uma solução de primulina (50 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$), dissolvida numa mistura de acetona/ H_2O Milli-Q (80:20, v/v). Seguidamente, os *spots* foram observados recorrendo a uma lâmpada de luz ultravioleta (*Lamag*, $\lambda=254\text{ nm}$). A identificação das principais classes de fosfolípidos presentes em cada condição experimental foi realizada por comparação com os *spots* dos padrões de fosfolípidos aplicados na placa.

Para a quantificação das classes de fosfolípidos previamente separadas por TLC, os *spots* obtidos foram raspados da placa para tubos de vidro e quantificados através do

ensaio da quantificação de fósforo anteriormente descrito. Antes da leitura das absorvências das soluções, as amostras foram transferidas para *eppendorfs* (1 mL) e centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos usando uma centrífuga *Mini Spin Plus* (*Eppendorf*), de modo a depositar a sílica e permitir a quantificação do fosfato. De seguida, calculou-se a percentagem de cada classe em função da quantidade total de fosfolípido recuperada da placa de TLC, obtendo-se, assim, uma abundância relativa para cada classe de fosfolípido.

2.6. Análise e quantificação de ácidos gordos por GC-MS

A análise dos ácidos gordos que se encontram nos extratos lipídicos de cada condição estudada nas células (n=3) e no plasma (n=15) foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS). De modo a permitir esta análise por GC-MS foi necessário derivatizar as amostras, recorrendo à transmetilação de ácidos gordos. Assim, os ácidos gordos metilados são voláteis, sendo desta forma possível a sua análise pela técnica em questão. O processo de transmetilação seguiu as linhas gerais da metodologia (72) proposta pela União Internacional da Química Aplicada (IUPAC). De forma breve, o método baseia-se na adição de hidróxido de potássio em metanol com o objetivo de formar ésteres metílicos de ácidos gordos. Sendo assim, transferiu-se 30 µL do extrato lipídico obtido de cada condição experimental, correspondentes a 30 µg de fosfolípidos, para um tubo, previamente lavado com *n*-hexano. Foram feitas análises em duplicado para cada amostra. Os tubos foram secos numa corrente de azoto, de modo a evaporar por completo o CHCl₃. Seguiu-se a adição de 1 mL de *n*-hexano a cada tubo e de 200 µL de hidróxido de potássio (2 M) em metanol. Agitou-se vigorosamente num vórtex durante 2 minutos e adicionaram-se 2 mL de solução saturada de cloreto de sódio. De forma a separar as duas fases, realizou-se a centrifugação durante 5 minutos a 2000 rpm. Recolheu-se a fase orgânica para um *eppendorf*, previamente lavado com metanol, tendo o cuidado de não retirar mais de 800 µL de fase orgânica, de modo a não recolher sais, e levou-se à secura numa corrente de azoto. Para a análise por GC-MS, as amostras foram dissolvidas em 80 µL de *n*-hexano, tendo-se injetado 4 µL dessa solução resultante no cromatógrafo gasoso GCMS-QP2010 Ultra (*Shimadzu*, Quioto, Japão). O cromatógrafo estava equipado com um injetor automático e uma coluna DB-FFAP com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura (*J&W Scientific*, Folsom, CA). Cada amostra foi injetada em modo *splitless*, com um tempo de *splitless* de 2 minutos, a 250 °C. Inicialmente, o programa de temperaturas iniciou-se a 80

°C, durante 3 minutos, seguindo-se um aumento de temperatura a uma taxa de 25 °C/minuto até se atingirem os 160 °C. A esta temperatura seguiu-se um novo aumento, a uma taxa de 30 °C/minuto até aos 250 °C, tendo-se mantido a esta temperatura durante 10 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a uma taxa de fluxo de 43,6 cm/segundo. O espetrómetro de massa acoplado ao GC, continha uma fonte de ionização de impacto eletrónico operada a 200 °C e um detetor do tipo quadrupolar. Os espectros foram adquiridos em modo *full scan* na gama de valores de m/z 35-700 em ciclos de 0,3 s. A identificação dos ácidos gordos de cada amostra foi feita por comparação do tempo de retenção e dos espectros de massa com padrões comerciais de ácidos gordos metilesterificados (*Supelco 37 Component FAME Mix*) e pela confirmação através de comparação com os espectros de massa da biblioteca “*The AOCS Lipid Library*” (73).

2.7. Análise e quantificação das classes de fosfolípidos por HPLC-MS

De modo a analisar o perfil lipídico das células de monócitos THP-1 e do plasma de doentes com SLE em fase de recaída e de remissão, permitindo, assim, identificar as diferenças entre cada uma das condições, recorreu-se à técnica de HPLC-MS. Os fosfolípidos foram separados através da cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC-LC/MS) utilizando um sistema de HPLC *Thermo Accela* com injetor automático acoplado *on-line* ao espetrómetro de massa *Q Exactive Orbitrap* (*Thermo*, Alemanha). Para a análise, misturaram-se alíquotas de 5 µL de amostra (correspondente a 5 µg de extrato de fosfolípidos) com 0,5 µL de uma mistura de padrões em 100 µL de eluente B (60 % ACN e 40 % de MeOH com 1 Mm de acetato de amónio). Os 5 µL desta mistura foram introduzidos numa coluna *Ascentis Si HPLC Pore* (15 cm x 1,0 mm, 3 µm; *Sigma-Aldrick*), mantida a 30 °C. O caudal foi ajustado para 40 µL/min e o gradiente de solvente utilizado foi o programado da seguinte forma: 0% de eluente A (10 % de H₂O e 55 % de ACN com 35 % de MeOH (v/v)), durante 8 minutos; seguiu-se um aumento linear para 60 % de eluente A, durante 7 minutos, no qual se manteve durante 22 minutos, até retornar às condições iniciais, em 3 minutos. A análise dos fosfolípidos foi conseguida através de um espetrómetro de massa do tipo *Q exactive orbitrap* com uma fonte de iões *elektrospray* aquecida (HESI) nos modos positivo e negativo. A fonte de HESI operou a uma voltagem de 3 kV no modo positivo e 2,7 kV no negativo. A taxa de fluxo de gás foi mantida a 20 unidades, a temperatura do capilar foi de 250 °C, o potencial das S-lentes RF foi igual a 50 unidades e a temperatura da sonda aquecida igual a 100 °C. A calibração da massa foi realizada a cada 7 dias para garantir uma precisão da massa inferior a 5 ppm. Para a

aquisição dos espectros de massa definiu-se um método dependente dos dados (*data dependente*). O método de aquisição foi em *full scan* entre os m/z 200 e 1600, resolução de 70000, controlo automático de ganho de 1×10^6 e 2 microscans. Os 10 iões mais intensos foram sucessivamente fragmentados na célula de colisões HCD. A energia de colisão variou entre 25 e 35 eV. Os espectros de MS/MS foram adquiridos com uma resolução igual a 17500, ganho automático de controlo 1×10^5 , 1 microscan e janela de isolamento de m/z 1. O limite para a seleção de iões foi 2×10^4 contagens. O máximo de iões acumulados permitidos foi 100 ms para os espectros de MS e 50 ms para os espectros de MS/MS. A exclusão dinâmica foi definida para os 60 s. A análise dos espectros adquiridos, a fim de identificar o perfil em classes de fosfolípidos de cada condição experimental, foi efetuada por recurso ao programa de análise de dados *Xcalibur v3.3* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os espectros de massa foram processados e integrados no programa *MZmine v2.0* (74).

2.8. Análise estatística

Os resultados experimentais são apresentados em termos de média \pm desvio padrão. As diferenças existentes entre as condições experimentais foram estudadas utilizando a análise estatística de variância multivariada (MANOVA), a análise de variância com um fator (ANOVA) combinada com o teste *post-hoc* de Tukey, a análise discriminante baseada no teste de Fisher e a análise de componentes principais (PCA). Considerou-se o valor $p < 0,05$ como um indicador de significância estatística. A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* IBM SPSS versão 24.0 para o *windows*.

Capítulo 3

Avaliação das alterações no perfil lipídico em amostras de plasma de doentes com SLE ativo e inativo por espectrometria de massa

3. Avaliação das alterações no perfil lipídico em amostras de plasma de doentes com SLE ativo e inativo por espectrometria de massa

A SLE é uma doença autoimune complexa que envolve alterações no processo inflamatório de múltiplos órgãos, levando a fenótipos variados. Ainda pouco se sabe acerca dos mecanismos moleculares e de sinalização subjacentes a cada uma das fases, remissão ou recaída, da doença, o que dificulta prever/ diagnosticar de forma precisa em que fase a doença se encontra. Consequentemente, não é possível intervir terapêuticamente de uma forma direcionada para cada uma das fases e contrariar o efeito de agravamento dos sintomas. Como referido, esta doença é marcada por alterações a nível do sistema inflamatório, com um aumento de stresse oxidativo, o que pode levar a alterações a nível de lípidos e do perfil lipídico plasmático. Assim, neste trabalho pretendeu-se avaliar, recorrendo à espectrometria de massa, de que forma estas alterações poderão ser correlacionadas com modificações no perfil lipídico de doentes com SLE em fase de remissão (SLE inativo) e em fase de recaída (SLE ativo).

3.1. Resultados

3.1.1. Separação e quantificação das classes de fosfolípidos por TLC

A variação do perfil lipídico, em termos de perfil de classes de fosfolípidos, nas fases de recaída e de remissão do SLE foi analisada recorrendo à técnica de TLC. Os extratos lipídicos das amostras de plasma de SLE ativo (n=3), inativo (n=3) e sem doença (n=3) foram fracionados por TLC, tendo-se identificado seis classes fosfolipídicas pela comparação com padrões de fosfolípidos puros aplicados na mesma placa de TLC. Deste modo foi possível identificar seguintes classes de fosfolípidos nas três condições: lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomielina (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) fosfatidilglicerol (PG) (**Figura 5**).

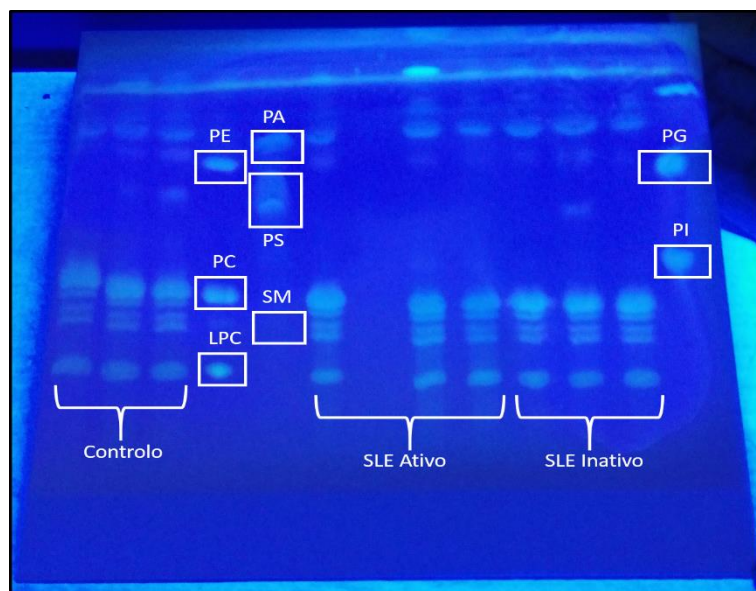


Figura 5 -Separação das classes de fosfolípidos presentes no extrato lipídico de amostras de plasma de doentes com SLE em fase de recaída (SLE ativo), fase de remissão (SLE inativo) e sem doença (controlo) através de TLC. As classes de fosfolípidos foram identificadas por comparação com padrões de fosfolípidos aplicados e devidamente identificados na placa de TLC: lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomiéline (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) e ácido fosfático (PA).

Após a separação das principais classes de fosfolípidos presentes nos extratos das amostras, realizou-se a quantificação do conteúdo fosfolipídico recorrendo ao ensaio da quantificação espectralométrica de fosfato. Esta técnica permitiu determinar a percentagem de cada classe de fosfolípidos presente nas condições estudadas (**Figura 6**). Nas três condições experimentais estudadas foi possível observar que as PC são a classe de fosfolípidos mais abundante, seguida da LPC, SM, PS, PE e, finalmente, PG. Nestes resultados é possível observar, pela análise estatística, alterações significativas ($p < 0,05$) na quantidade relativa de PC, LPC e PS. No caso da PC, esta aumenta tanto na condição de SLE ativo como inativo, comparativamente ao controlo, sendo esta alteração mais significativa no caso do SLE ativo. O conteúdo em LPC diminui em ambas as condições de doença estudadas, relativamente ao controlo, sendo esta diminuição mais significativa no caso do SLE inativo. Pela comparação entre o SLE ativo e inativo foi possível verificar alterações significativas na quantidade relativa de PS, tendo-se observado uma diminuição da PS no caso do SLE inativo.

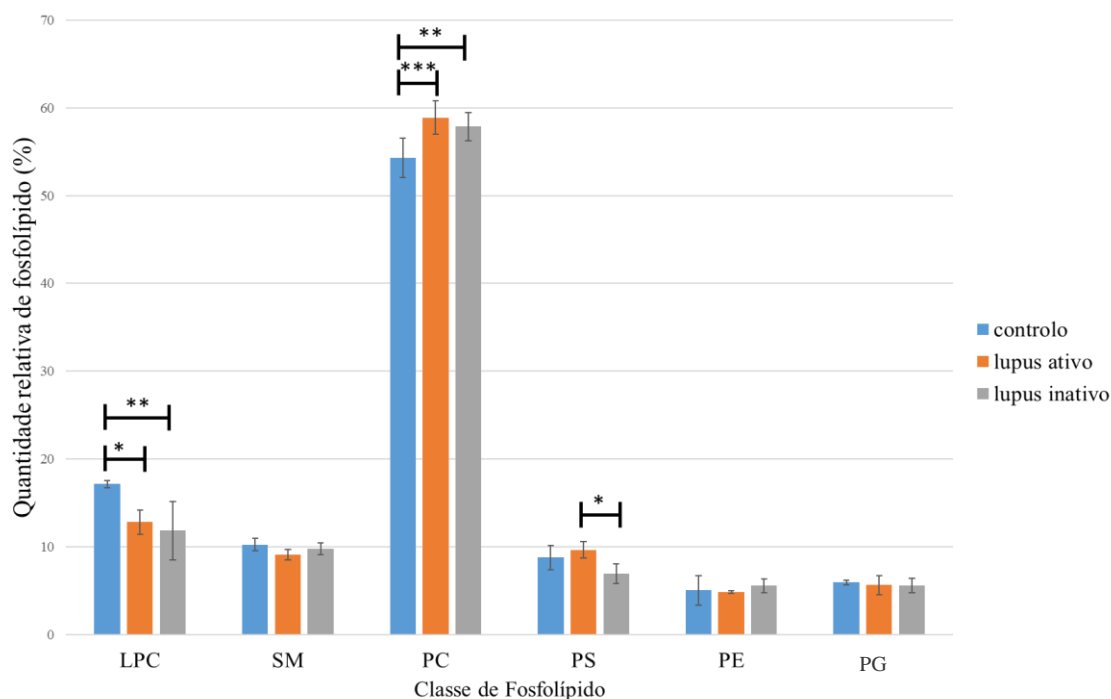


Figura 6- Percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos identificadas no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controle), de pacientes com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo). As classes de fosfolípidos foram separadas por TLC e a percentagem relativa de cada classe determinada pela quantificação espectrofotométrica de fósforo. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão de três amostras independentes (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.1.2. Análise do perfil de ácidos gordos por GC-MS

De modo a avaliar as alterações no perfil de ácidos gordos de amostras de plasma de pacientes com lúpus ativo, inativo, e de amostras de plasma de indivíduos sem doença, recorreu-se à identificação dos esteres metílicos dos ácidos gordos por GC-MS (**Figura 7**). A análise do cromatograma de GC-MS e dos espectros de massa respetivos, permitiu a identificação dos principais ácidos gordos presentes nos extratos lipídicos das amostras. Os ácidos gordos identificados foram o ácido tetradecanóico (C14:0), ácido hexadecanóico (C16:0), ácido octadecanóico saturado (C18:0) e ácido octadecanóico cis e trans (C18:1) e com duas ligações duplas (C18:2), ácido eicosanóico polinsaturado (C20:2, C20:3, C20:4) e, por fim, o ácido docosahecanóico (C22:6). A integração dos picos dos cromatogramas de GC-MS permitiu a quantificação dos ácidos gordos identificados e determinar a percentagem relativa de cada ácido gordo, permitindo, assim, verificar as alterações no perfil de ácidos gordos em pacientes com SLE em fase de remissão e de recaída. Nas três condições os ácidos gordos mais abundantes foram C16:0, C18:0 e C18:2. Observaram-se alterações significativas ($p < 0,05$) no perfil de ácidos gordos apenas no caso dos ácidos gordos C16:0 e C22:6. Quanto ao ácido gordo C16:0,

verificou-se uma diminuição da quantidade relativa deste ácido gordo no extrato lipídico correspondente ao SLE ativo, quando comparado com o controlo. Através da comparação dos extratos lipídicos do SLE ativo e inativo, verifica-se uma diminuição do ácido gordo C22:6 na condição ativa, quando comparada com a inativa. Assim, pacientes em fase de remissão possuem uma maior quantidade deste ácido gordo.

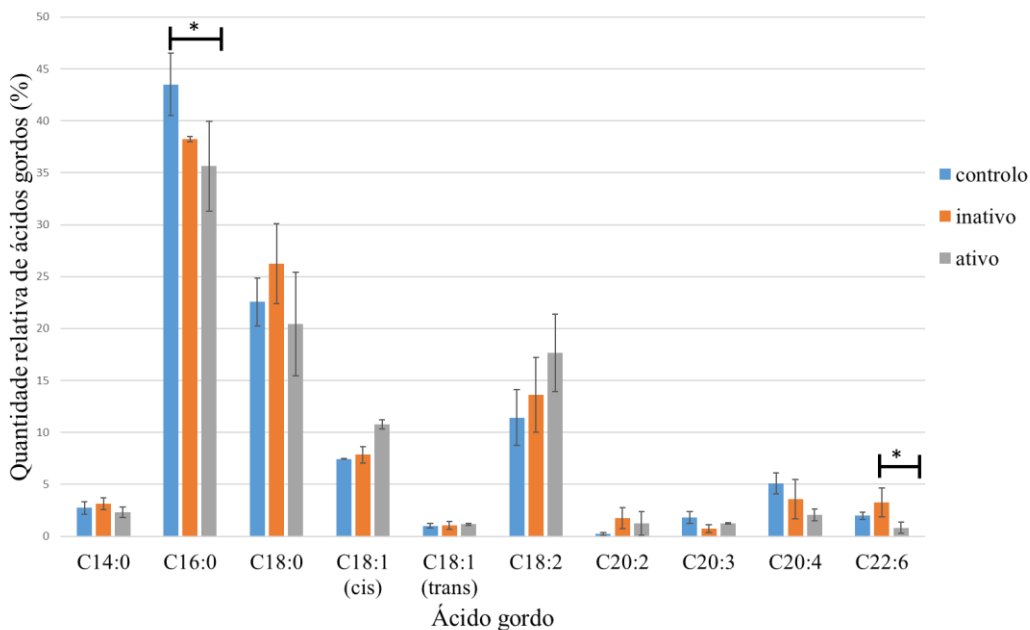


Figura 7- Percentagem relativa de ácidos gordos presentes no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controlo), com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo). O perfil dos ácidos gordos foi obtido pela análise do cromatograma e espectros de massa de GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão de três amostras independentes (n=3). * $p < 0,05$.

3.1.3. Análise do perfil de fosfolípidos por HPLC-MS/MS

As alterações na composição molecular de cada classe de fosfolípido, bem como as modificações ao nível do perfil molecular, foram avaliadas através da técnica de HPLC-MS e MS/MS. A análise dos extratos lipídicos do plasma sem doença, com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo), foi realizada no modo negativo para as classes de fosfolípidos PC, PS, PI e LPC. No modo positivo foram analisados os fosfolípidos PC, PE, PS e SM. Assim, foi possível identificar todas as classes de fosfolípidos que já tinham sido identificadas pelo TLC, sendo ainda possível identificar a classe da PI, não detetada no TLC, por ser uma técnica menos sensível. Os dados foram obtidos, no mínimo, em triplicados para cada uma das réplicas biológicas (n=5) de cada condição (n=3). Após a análise dos cromatogramas e dos espectros de HPLC-MS e MS/MS, os dados foram processados e integrados no *software* MZmine 2.0. De uma forma geral, no modo negativo os iões com maior abundância relativa nas condições

controle, SLE em fase de remissão e SLE em fase de recaída foram os pertencentes às classes PC, LPC e PS. No modo positivo os iões identificados com maior abundância relativa pertenciam às classes de fosfolípidos PC, PE e PS.

De modo a avaliar a significância dos resultados, os dados foram submetidos a uma análise estatística MANOVA. O teste de traço de Pillai foi o teste aplicado na análise de MANOVA aos dados obtidos por HPLC-MS no modo negativo ($F= 39,602$, $p= 0,001$) e positivo ($F= 5,639$, $p= 0,051$). Este teste demonstrou, assim, que existem diferenças significativas entre as três condições estudadas, após a análise dos dados obtidos por HPLC-MS no modo negativo, mas não no modo positivo, uma vez que o *p-value* não é menor que 0,05. Seguidamente, realizou-se uma análise estatística de ANOVA para determinar quais as classes de fosfolípidos que diferem entre as condições e que, assim, contribuem para a maior significância dos resultados. No modo negativo foi possível verificar que as PC e LPC são as classes de fosfolípidos que mais diferem entre as três condições e que, portanto, possuem um contributo mais elevado para a significância dos resultados ($p < 0,05$). Apesar de no modo positivo, o teste estatístico MANOVA não ter demonstrado diferenças entre as condições estudadas, o teste ANOVA evidenciou alterações significativas nas classes de fosfolípidos PC e PE. Na tabela seguinte é possível observar as espécies moleculares das classes fosfolipídicas identificadas pelo teste ANOVA no modo negativo e positivo (**Tabela 1**). O rácio F indica o tamanho da diferença entre as amostras, em função do tamanho da variação dentro de cada amostra. Por outras palavras, este rácio fornece uma medida da dispersão entre as médias das amostras. Sendo assim, quanto maior o valor de F, maior a diferença entre as amostras e maior a significância dos resultados. Uma maior significância dos resultados traduz-se num menor valor de *sigma/p-value* (**Tabela 1**).

Tabela 1- Espécies moleculares de fosfolípidos que mostraram variação mais significativa para as três condições em estudo, controlo, SLE ativo e SLE inativo, respetivos rácios F e valor de *p-value* obtidos através da análise ANOVA aplicada aos dados obtidos por HPLC-MS no modo negativo e positivo. As espécies moleculares fosfolipídicas foram identificadas pela massa teórica do programa *lipid maps*. Designação dos fosfolípidos de acordo com o seu número de carbonos e insaturações (C:N).

Modo	Fosfolípido (C:N)	F	<i>P-value</i>
Negativo	LPC (16:0)	4,540	0,018
	LPC (16:1)	11,773	0,000
	LPC (18:1)	9,176	0,001
	LPC (18:2)	6,284	0,005
	LPC (18:3)	5,255	0,011
	LPC (20:1)	5,150	0,012
	PC (30:0)	13,654	0,000
	PC (32:0)	6,023	0,006
	PC (32:1)	9,610	0,001
	PC (34:1)	5,414	0,009
	PC (34:3)	6,771	0,004
	PC (36:3)	4,837	0,015
	PC (36:5)	4,699	0,016
	PC (38:5)	4,965	0,013
	PC (38:6)	7,438	0,002
	PC (40:8)	5,229	0,01
Positivo	PC (30:1)	16,014	0,000
	PC (32:0)	4,033	0,028
	PC (32:1)	9,541	0,001
	PC (34:0)	5,478	0,009
	PC (34:1)	5,284	0,011
	PC (34:3)	5,266	0,011
	PC (36:3)	4,757	0,016
	PC (38:3)	4,381	0,021
	PC (38:6)	3,857	0,032
	PE (34:1)	3,562	0,040

	PE (34:2)	3,925	0,030
	PE (36:1)	6,367	0,005
	PE (36:3)	6,149	0,006
	PE (36:4)	3,562	0,040
	PE (38:3)	8,806	0,001
	PE (40:5)	15,084	0,000
	PE (40:6)	11,062	0,000

O teste ANOVA indica apenas se existem diferenças nas classes de fosfolípidos em todas as condições estudadas, não indicando entre quais condições as classes de fosfolípidos diferem. Sendo assim, realizou-se um teste à posteriori, denominado teste *post-hoc* de *Tukey*, para confirmar as diferenças entre grupos e indicar quais as condições onde existem alterações significativas das classes evidenciadas pelo teste ANOVA. Na análise em modo negativo, este teste permitiu identificar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os extratos lipídicos das condições controlo e SLE em fase de recaída (ativo) nas espécies moleculares LPC (18:1), LPC (18:2), LPC (18:3), LPC (20:1). Relativamente à comparação entre as condições controlo e SLE em fase de remissão (inativo) foi possível observar diferenças significativas nas espécies moleculares dos fosfolípidos LPC (16:0), LPC (18:2), PC (30:0), PC (32:0), PC (32:1), PC (34:1), PC (36:3), PC (38:6), PC (40:8). Por último, as diferenças significativas entre as condições dos dois estádios da doença, SLE em fase de recaída (ativo) e SLE em fase de remissão (inativo), foram observadas nos fosfolípidos LPC (16:1), LPC (18:1), PC (30:0), PC (32:1), PC (34:1), PC (34:3), PC (38:5), PC (38:6), PC (40:8).

No modo positivo, ao comparar a condição controlo e SLE em fase de remissão (inativo), verificou-se que os fosfolípidos que mais contribuem para as diferenças entre as condições são PC (30:1), PC (32:0), PC (32:1), PC (34:0), PC (36:3), PC (38:3), PE (34:1), PE (34:2), PE (36:1), PE (40:5) e PE (40:6). Relativamente à condição controlo e SLE em fase de recaída (ativo) observou-se que os fosfolípidos que produzem diferenças mais significativas entre estas condições são PE (40:5) e PE (40:6). As condições de patologia, ou seja, SLE em fase de recaída (ativo) e SLE em fase de remissão (inativo) são distinguidas estatisticamente pelos fosfolípidos PC (30:1), PC (32:1), PC (34:0), PC (34:1), PC (34:3), PC (36:3), PE (34:1), PE (34:2), PE (36:1), PE (36:3), PE (38:3) e,

finalmente, PE (40:5). Pela análise dos dados, é possível observar que os fosfolípidos PC (32:0), PC (32:1), PC (34:1), PC (34:3), PC (36:3) e PC (38:6) apresentaram diferenças significativas nas condições estudadas, tanto no modo negativo, como no modo positivo.

Para além da análise multivariada de MANOVA, foi utilizada uma outra análise multivariada, conhecida como análise discriminante de Fisher. A análise discriminante é utilizada com o objetivo de discriminar entre grupos, analisando dados com uma variável categórica dependente e variáveis de escala intervalar independentes. Esta análise permite distinguir os membros entre grupos, de modo a que, conhecidas as características de um novo indivíduo, se possa prever a que grupo este pertence. Nesta análise para cada variável preditiva, existe um valor de λ de Wilks associado, que quanto mais próximo de 0 maior a diferença entre as médias dos grupos. O valor obtido para esta análise tanto no modo negativo como no modo positivo foi igual a 0,000. Relativamente às funções discriminantes, uma vez que temos três variáveis dependentes, ou seja, condição controlo, SLE em fase de remissão (inativo) e em fase de recaída (ativo), a análise estatística apresenta duas funções discriminantes (número de variáveis dependentes-1), função 1 e função 2. No modo negativo, a função 1 permite explicar 77 % da variância significativa expressa nos resultados e a função 2 23 % da variância obtida. Relativamente ao modo positivo, a função 1 permite interpretar 67,5 % da variância com significado estatístico presente entre as condições e a função 2 permite explicar 32,5 % desta mesma variância. Nas tabelas seguintes (**Tabela 2** e **tabela 3**) é possível observar os valores dos grupos centróides para cada função canónica, função 1 e função 2, formada pelo teste discriminativo. Os grupos centróides fornecem o valor da função discriminante avaliada através dos valores médios de cada condição. Sendo assim, caso se adicionassem novos dados, ou seja, novas espécies moleculares de fosfolípidos, estes seriam caracterizados como pertencendo a uma determinada condição, dependendo da proximidade da sua pontuação aos valores centróides de cada condição. Através dos dados relativos aos grupos centróides é possível observar que tanto a função 1 como a função 2 diferenciam bastante bem entre as condições controlo, SLE ativo e SLE inativo. De notar que, em ambos os modos, as diferenças entre as condições SLE ativo e SLE inativo são mais demarcadas pela função 1 do que pela função 2. Assim, pode-se afirmar que a função 1 é a que permite obter uma maior significância de resultados entre estas duas condições. Além disso, pelos resultados pode observar-se que no modo negativo a distinção entre as

três condições através das funções canônicas de Fisher é mais evidenciada do que no modo positivo.

Tabela 2- Grupos centróides obtidos pelas funções discriminantes canônicas formadas através da análise discriminante de Fisher dos dados obtidos por HPLC-MS no modo negativo.

Função Condição	1	2
Controlo	-2,864	11,685
Inativo	16,764	-2,891
Ativo	-12,528	-5,034

Tabela 3- Grupos centróides obtidos pelas funções discriminantes canônicas formadas através da análise discriminante de Fisher dos dados obtidos por HPLC-MS no modo positivo.

Função Condição	1	2
Controlo	-1,232	4,362
Inativo	-4,515	-2,246
Ativo	4,340	-1,039

Tal como na análise de variância estatística de ANOVA e do teste de *post-hoc* de Tukey, também a análise discriminante de Fisher nos fornece a indicação das classes de fosfolípidos que mais contribuem para a diferença notável entre as três condições. Estes fosfolípidos possuem a designação de coeficientes de função de Fisher e são selecionados devido à obtenção de uma pontuação discriminante mais elevada. Para além das classes de fosfolípidos já indicados pelo teste ANOVA (**Tabela 1**), verificou-se que no modo negativo os fosfolípidos LPC (20:3), LPC (20:4), LPC (22:6), PC (34:2), PC (36:1), PC (36:2), PI (38:6) e PS (38:7) também contribuem para as diferenças significativas observadas nas três condições. Desta forma, verifica-se que, de uma forma geral, no modo negativo, as classes de fosfolípidos PC e LPC são aquelas que mais contribuem para distinguir entre as amostras controlo, SLE em fase de remissão e SLE em fase de recaída.

Relativamente ao modo positivo, as classes de fosfolípidos PC (26:0), PC (28:0), PC (34:2), PC (36:1), PC (36:2), PC (36:3), PC (36:5) foram também indicadas como fosfolípidos que permitem discriminar entre condições. Assim, no modo positivo a classe de fosfolípidos PC é aquela que possui uma contribuição maioritária para a diferenciação entre condições patológicas e sem doença.

A análise estatística de componentes principais (PCA) foi realizada para todas as espécies moleculares de fosfolípidos identificadas no modo negativo para as condições controlo, SLE inativo e SLE ativo. Tal como a análise discriminante de Fisher efetuada, também o PCA permitiu obter uma separação total das condições estudadas (**Figura 8**). Na figura 8 é possível observar que, no modo negativo, as réplicas de cada condição se encontram próximas do seu respetivo centróide, demonstrando, assim, que não existem *outliers* e que as réplicas se encontram bem agrupadas por condição. A função 1, que representa 77 % da variância, permite claramente distinguir entre a condição SLE ativo e SLE inativo. Relativamente, à função 2, esta contribui maioritariamente para a distinção entre a condição controlo e as condições de patologia, ou seja, SLE ativo e SLE inativo.

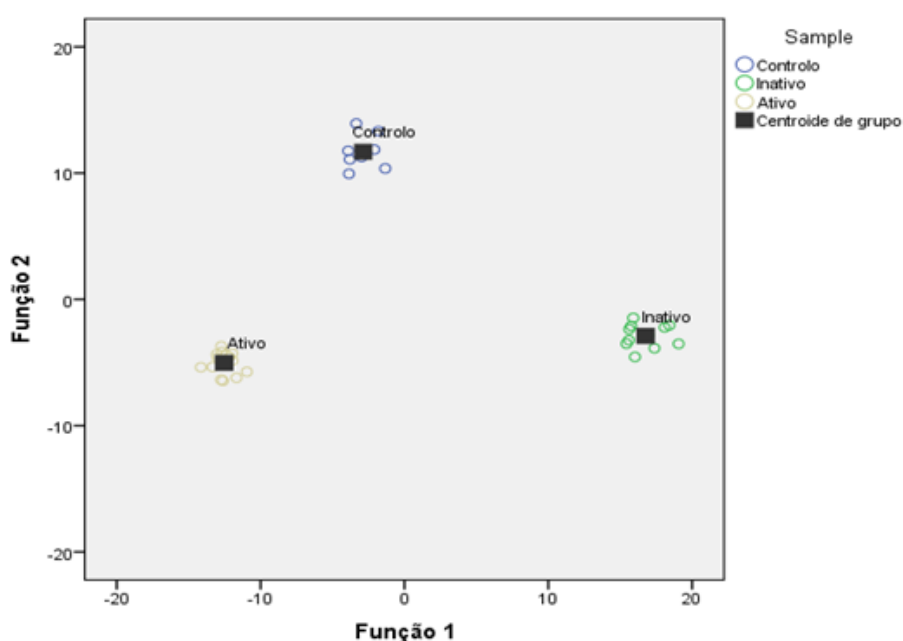


Figura 8- Representação gráfica das pontuações de PCA (componente principal 1 (Função 1) *versus* componente principal 2 (Função 2)) obtidas pela análise multivariada dos extratos lipídicos das condições sem doença (controlo), com SLE em fase de remissão (inativo) e com SLE em fase de recaída (ativo). Esta representação considera as classes de fosfolípidos identificadas pela técnica de HPLC-MS no modo negativo.

Quanto aos dados obtidos por HPLC-MS no modo positivo, foi também realizada uma análise de PCA. Apesar de tal como no modo negativo, neste modo se obter de igual

forma uma separação total entre as condições, é possível observar que as amostras já não se encontram tão próximas do seu grupo centróide (**Figura 9**). Assim, verifica-se uma maior dispersão dos resultados relativamente ao modo negativo. Este facto já tinha sido observado pelo teste de Fisher em que os grupos centróides de cada função já não se encontram tão distanciados numericamente e, por isso, não permitem tão eficazmente separar as réplicas por condição. A função 1 é a função responsável por distinguir entre a condição SLE ativo e SLE inativo e, por sua vez, a função 2 permite diferenciar entre as amostras controlo e as condições de doença, em fase de remissão e em fase de recaída.

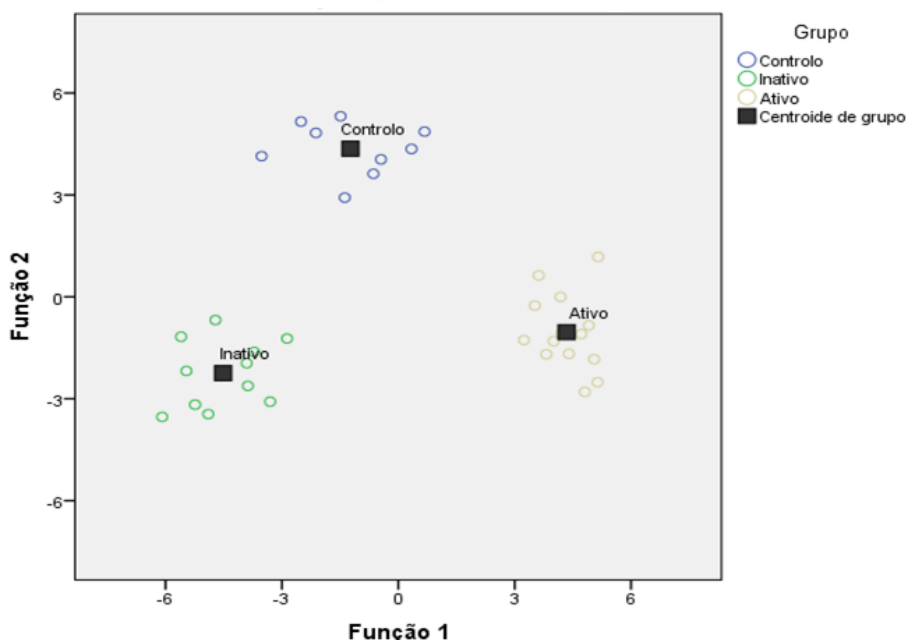


Figura 9- Representação gráfica das pontuações de PCA (componente principal 1 (Função 1) *versus* componente principal 2 (Função 2)) obtidas pela análise multivariada dos extratos lipídicos das condições sem doença (controlo), com SLE em fase de remissão (inativo) e com SLE em fase de recaída (ativo). Esta representação considera as classes de fosfolípidos identificadas pela técnica de HPLC-MS no modo positivo.

Após a descrição dos resultados quanto às classes de fosfolípidos identificadas na sua totalidade, serão descritos os resultados por classe fosfolipídica. Apenas serão mencionadas as classes em que se verificam alterações significativas ($p < 0,05$) na sua abundância relativa e que, desta forma, permitem retirar conclusões acerca dos resultados.

A classe de fosfolípidos PC foi observada nos espetros de HPLC-MS no modo negativo sob a forma de aductos de acetato $[M+CH_3COO]^-$ e no modo positivo como iões $[M+H]^+$ (**Tabela 4**). Relativamente ao modo negativo, em todas as condições estudadas a PC (34:2), de m/z 816,5775, demonstrou ser a espécie molecular de PC mais abundante, seguida das espécies moleculares PC (34:1), PC (36:2), PC (36:4) e PC (36:3). Os dados

foram submetidos a uma análise de MANOVA, tendo-se verificado uma elevada significância entre as três condições, controlo, SLE ativo e SLE inativo. O teste multivariável utilizado foi o teste de Traço de Pillai ($F= 39,602$, $p= 0,001$). Como é possível verificar pelo valor de *p-value*, as três condições avaliadas são diferentes entre si e significativas. O teste estatístico ANOVA permitiu identificar as espécies moleculares que contribuem para a separação entre condições, sendo elas PC (34:1), PC (36:3), verificando-se também diferenças nas menos abundantes PC (32:1), PC (34:3), PC (36:5), PC (38:6), PC (30:0), PC (40:8) e PC (32:0). De modo a confirmar as diferenças entre grupos e indicar quais as condições onde existem alterações significativas da classe de PC, realizou-se o teste *post-hoc* de Tukey. Este teste estatístico permitiu identificar diferenças significativas ($p<0,05$) entre os extratos lipídicos das condições controlo e SLE inativo nos fosfolípidos PC (34:1), PC (36:3), PC (32:1), PC (38:6), PC (30:0), PC (40:8) e PC (32:0). Em todos estes casos, a abundância relativa das espécies moleculares de PC é menor na condição SLE inativo relativamente ao controlo. Comparando o controlo com a condição de SLE ativo, foi possível observar que a PC (36:5) diminui significativamente na condição SLE ativo. Por último, verificou-se uma diminuição significativa na condição SLE inativo comparativamente à condição SLE ativo de uma das espécies moleculares de PC mais abundantes, a PC (34:1), e de espécies moleculares menos abundantes, PC (32:1), PC (34:3), PC (38:6), PC (30:0), PC (40:8), PC (38:5) (**Figura 10**).

Tabela 4- Estatística descritiva das espécies moleculares de PC identificadas por HPLC-MS/MS no modo negativo como iões $[M+CH_3COO]^-$ e classificadas através do teste ANOVA e *post-hoc* de Tukey.

Fosfolípido (C:N)	<i>m/z</i>	Condição	Área	Desvio padrão
PC (34:2)	816,5827	Controlo	279,1734	94,3912
		Inativo	214,2912	25,6686
		Ativo	256,3146	62,4666
PC (34:1)	818,5910	Controlo	148,2868	27,3738
		Inativo	115,4526	19,0016
		Ativo	143,6720	29,5949
PC (36:2)	844,6070	Controlo	87,0787	16,7039
		Inativo	86,2065	7,1404
		Ativo	99,39125	30,9121

PC (36:4)	840,5767	Controlo	89,7468	23,7184
		Inativo	73,1636	15,9824
		Ativo	77,1154	18,8319
PC (36:3)	842,5915	Controlo	73,9368	22,7729
		Inativo	54,4224	7,6116
		Ativo	68,9938	14,5797
PC (36:1)	846,6184	Controlo	19,5442	1,7347
		Inativo	19,6389	2,3988
		Ativo	22,6661	8,0134
PC (38:3)	870,6219	Controlo	17,4193	4,7647
		Inativo	13,6111	2,4343
		Ativo	16,0352	5,0625
PC (38:5)	866,5914	Controlo	15,3261	2,9943
		Inativo	15,5240	4,0088
		Ativo	18,4750	4,4997
PC (32:1)	790,5614	Controlo	12,4956	6,5707
		Inativo	5,6685	2,1009
		Ativo	12,2170	3,8097
PC (42:6)	860,6017	Controlo	10,5820	3,9562
		Inativo	8,6894	1,6679
		Ativo	9,6511	1,8751
PC (40:6)	892,6078	Controlo	7,3999	1,7481
		Inativo	6,6637	2,3974
		Ativo	9,2349	4,2547
PC (34:3)	814,5618	Controlo	6,4667	1,9050
		Inativo	4,2321	0,8180
		Ativo	7,641355	3,3237
PC (36:5)	838,5578	Controlo	3,4527	0,7586
		Inativo	5,0817	2,5708

		Ativo	6,0637	1,9594
PC (38:6)	804,5694	Controlo	5,6744	1,0797
		Inativo	4,2386	0,8329
		Ativo	5,7290	1,2306
PC (30:0)	764,5454	Controlo	2,23247	1,0626
		Inativo	1,1365	0,3869
		Ativo	2,70283	0,8036
PC (40:5)	894,6220	Controlo	2,71105	0,6241
		Inativo	2,48828	0,9155
		Ativo	3,49302	1,6121
PC (40:8)	828,5760	Controlo	2,575251	0,7293
		Inativo	1,927047	0,3132
		Ativo	2,490735	0,5011
PC (32:0)	776,5822	Controlo	1,107948	0,4006
		Inativo	0,740785	0,0893
		Ativo	0,972382	0,1485
PC (38:5)	806,5853	Controlo	0,845943	0,1567
		Inativo	0,727579	0,1360
		Ativo	0,922389	0,1742

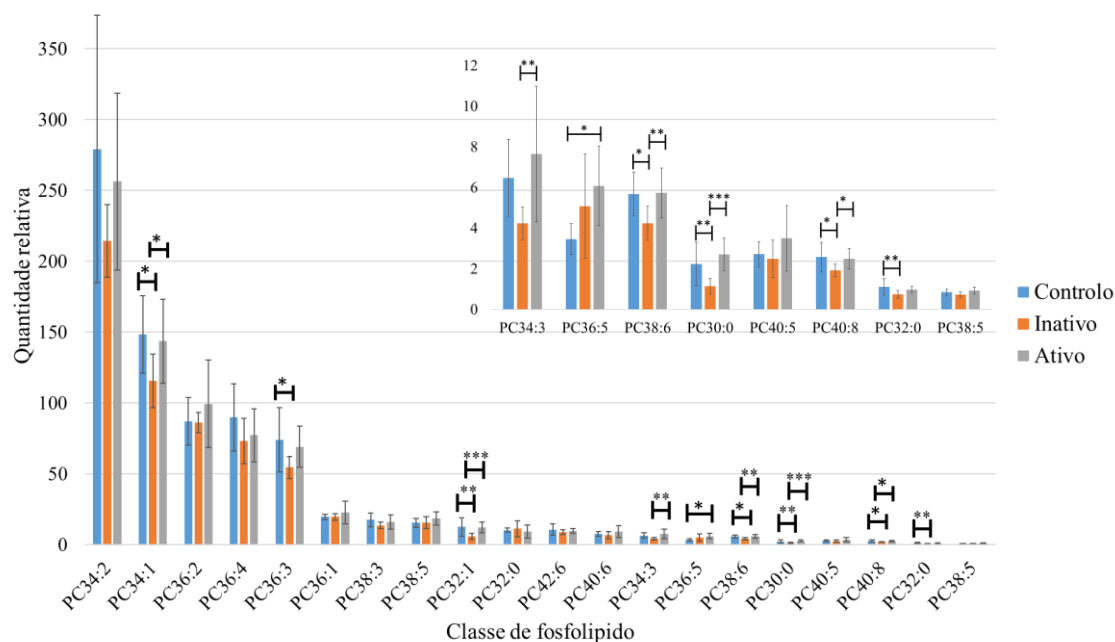


Figura 10- Percentagem relativa de fosfolípidos da classe PC presentes no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controlo), com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo) após a análise por HPLC-MS no modo negativo como iões $[M+CH_3COO]^-$. Identificação das espécies moleculares de PC com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A classe de fosfolípidos PC foi também analisada por HPLC-MS e MS/MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$ (**Tabela 5**). A análise estatística de MANOVA, utilizando o teste de Traço de Pillai, demonstrou que a abundância relativa desta classe de fosfolípidos é diferente entre as condições estudadas ($F = 7,778$; $p\text{-value} = 0,000$). A análise por ANOVA permitiu identificar alterações significativas ($p < 0,05$) nas espécies moleculares PC (30:1), PC (32:1), PC (34:0), PC (34:1), PC (36:3), PC (36:4), PC (38:3) e, por fim, PC (38:6). De modo a identificar as condições em que as espécies moleculares de PC mencionadas diferem, realizou-se o teste de *post-hoc* de Tukey. Através deste teste verificou-se que a abundância relativa das espécies moleculares PC (30:1), PC (32:1), PC (34:0), PC (36:3), PC (36:4) e PC (38:3) diminui significativamente na condição SLE em fase de remissão (inativo) relativamente ao controlo. Comparando a condição SLE ativo e controlo, não se observaram diferenças significativas em nenhuma classe de PC. Por sua vez, ao analisar as duas fases da patologia, remissão (inativo) e recaída (ativo), verificou-se que a condição SLE inativo apresenta uma diminuição significativa das espécies moleculares de PC (30:1), PC (32:1), PC (34:0), PC (34:1), PC (36:3) e PC (38:6) (**Figura 11**). Comparando os resultados significativos com o modo negativo, é possível

observar que as espécies moleculares PC (32:1), PC (34:1) e PC (38:6) variam tanto no modo negativo, como no modo positivo.

Tabela 5- Estatística descritiva das espécies moleculares de PC identificadas por HPLC-MS/MS no modo positivo sob a forma de iões $[M+H]^+$ e classificadas através do teste ANOVA e *post-hoc* de Tukey.

Fosfolípido (C:N)	<i>m/z</i>	Condição	Área	Desvio padrão
PC (34:2)	758,5694	Controlo	330,8494	138,6766
		Inativo	212,1520	55,9418
		Ativo	318,5985	116,5916
PC (34:1)	760,5826	Controlo	163,3650	44,6054
		Inativo	112,3599	32,4925
		Ativo	173,6517	60,0102
PC (36:4)	786,5989	Controlo	121,7829	42,3630
		Inativo	83,0159	27,0000
		Ativo	103,5695	34,4392
PC (36:2)	786,5989	Controlo	107,8222	35,0532
		Inativo	89,7284	20,8634
		Ativo	128,1674	63,1497
PC (36:3)	784,5833	Controlo	92,4468	34,0591
		Inativo	58,7525	16,0174
		Ativo	89,3228	31,4230
PC (38:4)	810,5988	Controlo	45,7272	12,6288
		Inativo	38,8040	10,0328
		Ativo	43,4038	16,3132
PC (38:6)	806,5678	Controlo	41,9306	17,3722
		Inativo	29,7496	8,9623
		Ativo	43,1769	11,8427
PC (36:5)	780,5507	Controlo	32,4304	12,8942
		Inativo	27,0274	10,2850
		Ativo	36,0139	7,1665

PC (38:5)	808,5820	Controlo	26,6431	7,9719
		Inativo	24,2504	6,2600
		Ativo	31,1979	10,1369
PC (36:1)	788,610	Controlo	21,6303	3,9843
		Inativo	18,3310	4,2580
		Ativo	26,9894	15,1189
PC (38:3)	812,6136	Controlo	20,6770	6,2074
		Inativo	13,3886	3,3566
		Ativo	18,9161	7,1065
PC (34:0)	762,5901	Controlo	16,8874	3,0328
		Inativo	11,6547	3,4839
		Ativo	17,3937	5,9189
PC (28:0)	678,5061	Controlo	14,9281	1,6564
		Inativo	15,7092	1,8494
		Ativo	14,2413	1,8413
PC (32:1)	732,5525	Controlo	13,3585	6,2052
		Inativo	6,4589	2,7060
		Ativo	14,6258	6,3973
PC (32:0)	734,5677	Controlo	10,8034	2,1936
		Inativo	11,2884	3,2933
		Ativo	10,1405	5,1520
PC (40:6)	834,5989	Controlo	9,9037	2,9292
		Inativo	7,5983	2,2095
		Ativo	10,6770	4,1180
PC (34:3)	756,5527	Controlo	9,4897	3,5888
		Inativo	5,7705	2,2663
		Ativo	11,6787	6,0880
PC (40:7)	832,5851	Controlo	7,1318	2,1970
		Inativo	5,1796	1,0106

		Ativo	6,4479	2,0839
PC (40:5)	836,6127	Controlo	3,5025	0,9109
		Inativo	2,6502	0,7777
		Ativo	3,9770	1,8122
PC (30:1)	706,5371	Controlo	2,1342	0,9140
		Inativo	1,1814	0,3878
		Ativo	2,9142	0,8645
PC (26:0)	650,4728	Controlo	0,6426	0,0937
		Inativo	0,5730	0,0316
		Ativo	0,6948	0,2095

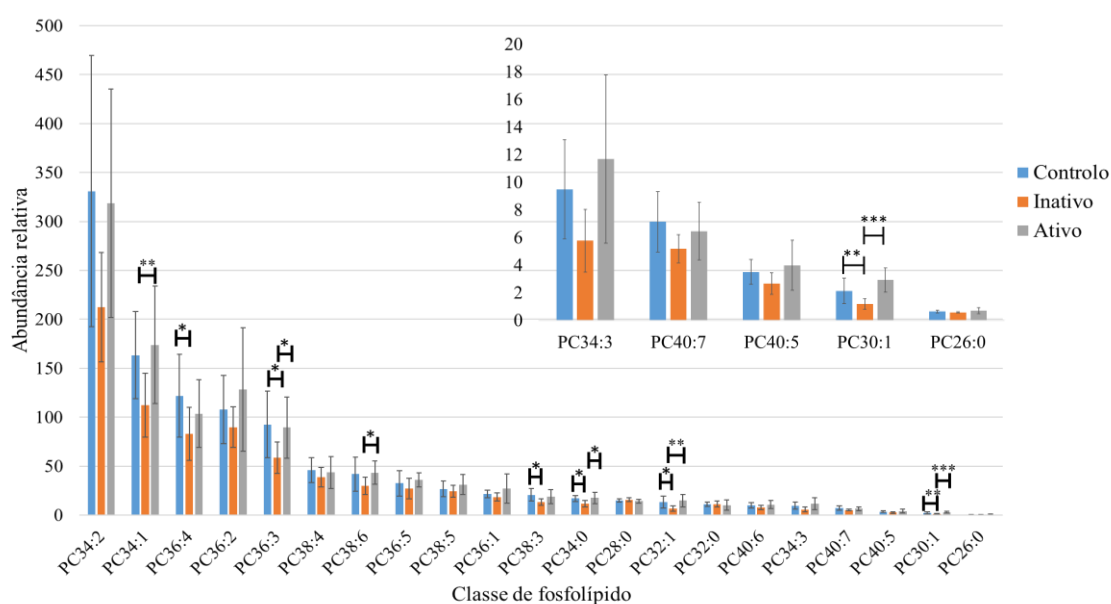


Figura 11- Percentagem relativa de fosfolípidos da classe PC presentes no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controlo), com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo) após a análise por HPLC-MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$. Identificação das espécies moleculares de PC com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Relativamente à classe de fosfolípidos LPC, esta foi analisada por HPLC-MS no modo negativo com formação de iões $[M+CH_3COO]^-$ (**Tabela 6**). A LPC (16:0) m/z 554,3474 demonstrou ser a espécie mais abundante nas condições controlo, SLE ativo e SLE inativo. A análise estatística MANOVA, demonstrou através do teste de Traço de Pillai ($F = 11,537$, $p\text{-value} = 0,000$) que os dados possuem uma elevada significância estatística entre si, ou seja, que as três condições diferem entre si. Através da análise ANOVA

observou-se que a abundância relativa das espécies moleculares LPC (16:0), LPC (16:1), LPC (18:1) e LPC (18:2) difere entre as condições controle, SLE ativo e SLE inativo. Por sua vez, o teste de *post-hoc* de Tukey permitiu revelar as condições em que a classe de LPC difere (**Figura 12**). Assim, a LPC (16:0) e a LPC (18:0) diminuem significativamente na condição SLE inativo relativamente ao controle. A LPC (18:1) aumenta na condição inativo relativamente à condição controle e na condição ativo relativamente à condição controle. Por último, a LPC (18:2) demonstrou uma maior abundância relativa significativa em ambos os estádios da doença SLE comparativamente ao controle.

Tabela 6- Estatística descritiva das espécies moleculares de LPC identificadas por HPLC-MS/MS no modo negativo sob a forma de iões $[M+CH_3COO]^-$ e classificadas através do teste ANOVA e *post-hoc* de Tukey.

Fosfolípido (C:N)	<i>m/z</i>	Condição	Área	Desvio padrão
LPC (16:0)	554,3474	Controlo	190,9228	80,1574
		Inativo	135,2701	25,6834
		Ativo	179,5473	27,4999
LPC (16:1)	552,3322	Controlo	3,4350	1,1210
		Inativo	2,5837	0,6679
		Ativo	4,1467	0,7066
LPC (18:0)	582,3789	Controlo	49,0160	16,8913
		Inativo	42,3684	9,1222
		Ativo	53,3242	12,2089
LPC (18:1)	580,3631	Controlo	20,2584	4,5576
		Inativo	24,2518	7,4617
		Ativo	31,5540	6,5303
LPC (18:2)	578,3474	Controlo	17,7123	4,8519
		Inativo	31,8111	11,9939
		Ativo	32,2150	11,5051
LPC (18:3)	576,3325	Controlo	0,1554	0,0467
		Inativo	0,32463	0,1596
		Ativo	0,5038	0,3690

LPC (20:1)	608,3949	Controlo	0,3370	0,1547
		Inativo	0,3736	0,05741
		Ativo	0,4910	0,1402
LPC (20:3)	604,3639	Controlo	2,1629	1,0278
		Inativo	1,9429	0,9601
		Ativo	2,5023	0,4477
LPC (20:4)	602,3475	Controlo	4,8714	1,6785
		Inativo	7,0359	2,4196
		Ativo	6,9804	2,6312
LPC (22:6)	626,3480	Controlo	1,1187	0,4312
		Inativo	1,4582	0,7652
		Ativo	1,7018	0,7710

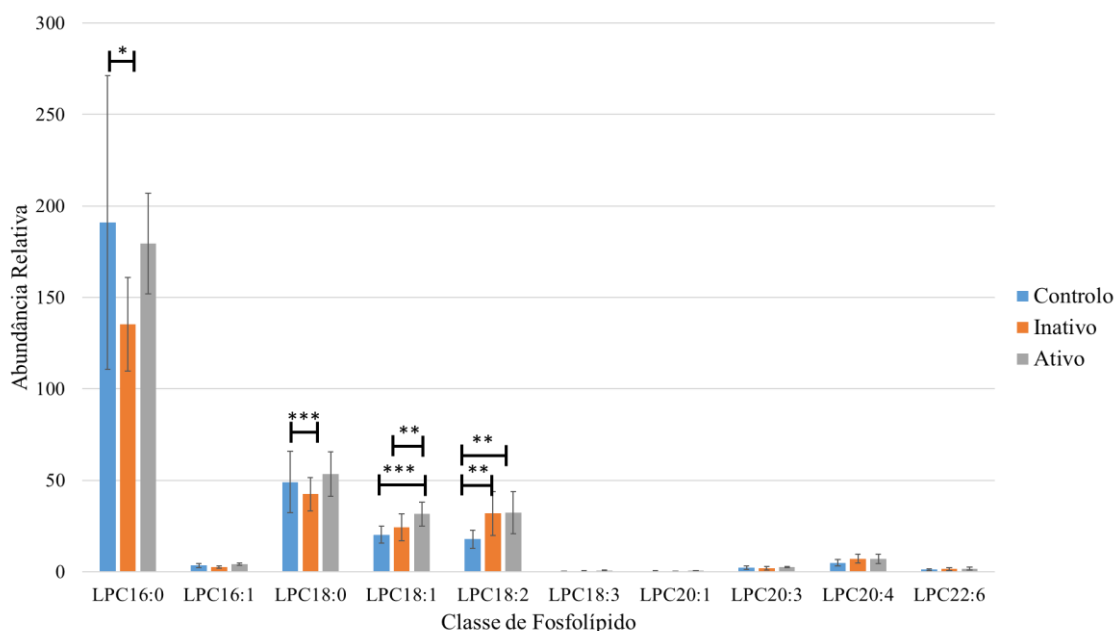


Figura 12- Abundância relativa de fosfolípidos da classe LPC presentes no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controlo), com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo) após a análise por HPLC-MS no modo negativo como iões $[M+CH_3COO]^-$. Identificação das espécies moleculares de LPC com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Relativamente à classe de fosfolípidos PE, esta foi analisada por HPLC-MS no modo positivo com formação de iões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ (**Tabela 7**). De uma forma geral, esta

classe não demonstrou possuir uma elevada abundância em nenhuma das condições estudadas. A espécie molecular mais abundante desta classe foi a PE (36:1) de m/z 746,5647. O teste de Traço de Pillai usado na análise estatística MANOVA demonstrou que a classe fosfolipídica PE apresenta alterações significativas entre as condições ($F=5,363$, $p\text{-value}=0,000$). As análises estatísticas seguintes, ANOVA e *post-hoc* de Tukey, foram utilizadas para identificar as espécies moleculares de PE que diferem entre as referidas condições. Assim, as espécies PE (34:1), PE (36:3), PE (38:3), PE (40:5) e PE (40:6) diminuem significativamente na condição de doença em fase de remissão (inativo) relativamente ao controlo. A condição SLE ativo apresenta diminuições estatisticamente significativas nas espécies moleculares PE (40:5) e PE (40:6) comparativamente ao controlo. A comparação entre os dois estádios da doença de SLE, em fase de remissão (inativo) e em fase de recaída (ativo), permitiu observar uma redução significativa das espécies PE (34:1), PE (34:2), PE (36:3), PE (38:3) e PE (40:5) na condição SLE inativo (**Figura 13**).

Tabela 7- Estatística descritiva das espécies moleculares de PE identificadas por HPLC-MS/MS no modo positivo sob a forma de iões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ e classificadas através do teste ANOVA e *post-hoc* de Tukey.

Fosfolípido (C:N)	m/z	Condição	Área	Desvio padrão
PE (36:1)	746,5647	Controlo	2,0320	0,7279
		Inativo	1,1361	0,6913
		Ativo	2,1475	0,7880
PE (36:3)	742,5361	Controlo	1,1199	0,3851
		Inativo	0,6109	0,2089
		Ativo	1,0161	0,4164
PE (36:2)	766,5356	Controlo	0,9152	0,1041
		Inativo	0,7254	0,2161
		Ativo	0,8953	0,4796
PE (38:4)	766,5408	Controlo	0,9036	0,0997
		Inativo	0,7098	0,1901
		Ativo	0,8759	0,4569
PE (40:6)	792,5592	Controlo	0,8315	0,3855
		Inativo	0,3137	0,1325

		Ativo	0,4858	0,2034
PE (34:1)	740,5214	Controlo	0,2779	0,0434
		Inativo	0,1165	0,0507
		Ativo	0,2298	0,1436
PE (36:4)	740,5214	Controlo	0,8150	0,1566
		Inativo	0,4879	0,1543
		Ativo	0,7666	0,4376
PE (34:2)	716,5219	Controlo	0,5277	0,2514
		Inativo	0,2293	0,1136
		Ativo	0,5991	0,4731
PE (34:0)	742,5361	Controlo	0,4479	0,1034
		Inativo	0,2764	0,1090
		Ativo	0,5456	0,4830
PE (32:1)	712,4930	Controlo	0,2204	0,2160
		Inativo	0,1836	0,1442
		Ativo	0,1595	0,1039
PE (38:3)	770,5623	Controlo	0,2000	0,0413
		Inativo	0,0919	0,0250
		Ativo	0,1586	0,0816
PE (40:5)	794,5653	Controlo	0,1436	0,0346
		Inativo	0,0526	0,0218
		Ativo	0,1030	0,0468

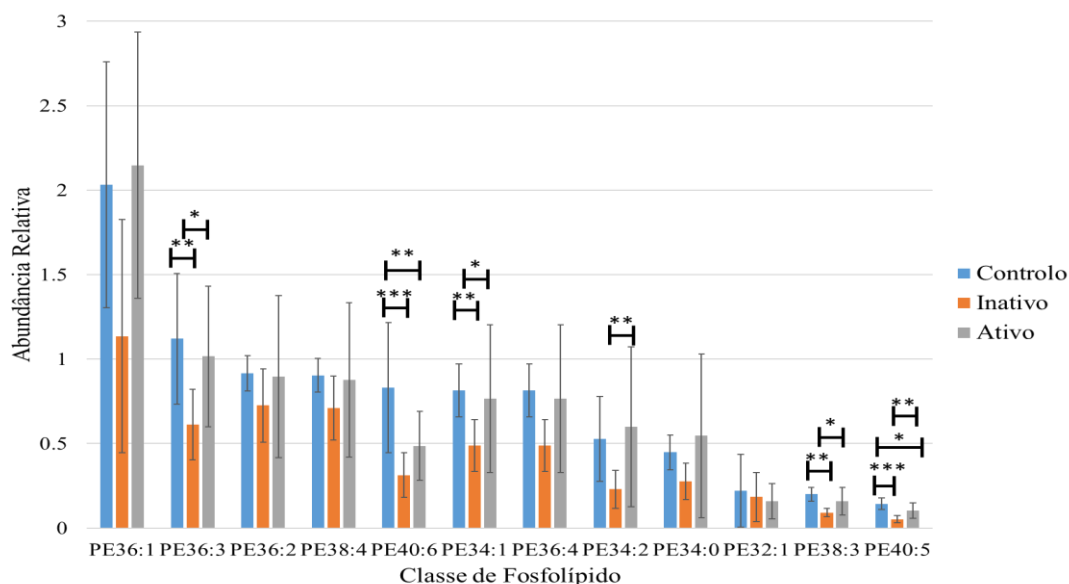


Figura 13- Abundância relativa de fosfolípidos da classe PE presentes no extrato lipídico de amostras de plasma sem doença (controle), com SLE em fase de recaída (ativo) e em fase de remissão (inativo) após a análise por HPLC-MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. Identificação das espécies moleculares de PE com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2. Discussão

A SLE é uma doença autoimune de etiologia desconhecida e cuja patogénese se encontra ainda em fase de descoberta. Esta é uma doença marcada por fases de remissão e recaída que podem estar associados a episódios de inflamação. Sendo assim, no presente trabalho avaliou-se as diferenças existentes entre o perfil lipídico de pacientes com SLE em fase de remissão e pacientes com SLE em fase de recaída, através de uma abordagem lipidómica. A análise multivariada de PCA demonstrou que as três condições são distintas, sendo esta distinção explicada pelas alterações no perfil lipídico. Os resultados demonstraram que os dois estadios da doença são marcados por variações significativas na classe de fosfolípidos PC, LPC e PE do plasma.

A análise do perfil de ácidos gordos por GC-MS permitiu observar uma diminuição significativa do ácido gordo C16:0 na condição SLE ativo, comparativamente ao controlo, e um aumento significativo do ácido gordo C22:6 na condição SLE inativo, quando comparada com a condição SLE ativo. Esta variação no perfil dos ácidos gordos pode refletir o mecanismo adotado pelas diferentes fases da doença, produzindo os dois fenótipos distintos. O aumento significativo do DHA, ácido gordo C22:6, na condição SLE inativo, comparativamente ao SLE ativo, está de acordo com a literatura, uma vez que níveis elevados de DHA se relacionam com uma menor severidade da doença (75).

Elkan *et al* (75) demonstraram que a presença de um maior nível de DHA nas células do tecido adiposo está associada a uma menor severidade da SLE e a uma menor presença de placas de aterosclerose. Isto pode ser explicado, uma vez que o ácido gordo de ômega-3 C22:6 DHA, possui um papel chave na resolução da inflamação, inibindo eventos pró-inflamatórios. O mecanismo através do qual os ácidos gordos de ômega-3 inibem os eventos pró-inflamatórios já se encontra definido (76). Os ácidos gordos podem ligar-se ao recetor ativado por proliferadores de peroxissomas (PPaR) α e PPaR γ . Estas moléculas são um grupo de proteínas recetoras nucleares que funcionam como fatores de transcrição que regulam a expressão de genes. Assim, os ácidos gordos de ômega-3 ligam-se às moléculas PPaR, inativando a transcrição de genes através da interação com moléculas de sinalização, como o NF- κ B. Esta interação inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias. O DHA permite, assim, diminuir a atividade das plaquetas e dos leucócitos, inibir a proliferação de linfócitos e diminuir moderadamente a pressão arterial (77). Deste modo, um nível mais elevado de DHA no plasma de pacientes com SLE, produz o fenótipo mais moderado da doença, SLE em fase de remissão. Por outro lado, uma maior concentração de DHA favorece a síntese de mediadores anti-inflamatórios e a favor da resolução da inflamação, as resolvinas da série D e as protectinas (78). O objetivo principal da resposta inflamatória é a depuração (do inglês, *clearance*) do agente agressor através do restabelecimento da homeostasia do tecido. Este restabelecimento ocorre através das vias de resolução que são ativadas após a resposta inflamatória aguda, formando mediadores lipídicos anti-inflamatórios e a favor da resolução. As resolvinas da série D e as protectinas são formados a partir do DHA pela ação sucessiva de lipoxigenases (79). Estes mediadores anti-inflamatórios são responsáveis pela inibição da produção de transcritos induzidos pelo TNF- α que codificam para a citocina pró-inflamatória IL-1 β , inibindo, consequentemente, a ação inflamatória.

A classe de fosfolípido PC é a classe mais abundante nas membranas biológicas e nas lipoproteínas plasmáticas, sendo esta a classe que se encontra presente em maior quantidade nas três condições estudadas. De uma forma geral, foi possível observar que, tanto no modo negativo como no positivo, a PC se encontra em maior abundância nas condições controlo e na condição SLE ativo, apresentando uma diminuição significativa na condição SLE inativo, comparativamente às restantes condições. Dada esta variação, podemos afirmar que a classe de fosfolípidos PC é de extrema importância para o fenótipo dos dois estadios da doença. As espécies moleculares PC (32:1)- (14:0/16:1); (16:0/16:1)-

PC (36:3)- (18:1/18:2)- e PC (38:6)- (16:0/22:6); (18:2/20:4)- apresentaram alterações estatisticamente significativas no modo negativo e positivo. No entanto, não foi possível relacionar o padrão dos ácidos gordos das espécies de PC com o observado no GC-MS, uma vez que nesta técnica foi apenas visível uma alteração significativa nos ácidos gordos C16:0 e C22:6. Treed *et al* (80) demonstraram que a administração do fosfolípido PC, nomeadamente das espécies moleculares PC (32:0), PC (34:2) e PC (36:4), impede a ativação do NF-κB por parte do TNF-α no plasma (80). O TNF-α é uma citocina do tipo *T helper 1* cuja expressão se encontra aumentada em algumas doenças inflamatórias, como é o caso da artrite reumatoide e da inflamatória do intestino. Por sua vez, o TNF-α ativa o fator de transcrição do NF-κB, levando à ativação de genes pró-inflamatórios. A classe de PC demonstrou inibir a ativação deste processo, diminuindo, assim, os eventos inflamatórios. Além disso, a ligação do TNF-α ao seu recetor TNF-α-R1, recruta-o para os *rafts* lipídicos (81). Os *rafts* são formados por esfingolípidos e colesterol, no folheto externo da membrana, e ligados a fosfolípidos e colesterol no folheto interno da bicamada fosfolipídica. Assim, estes autores (81) afirmam que uma alteração na concentração dos fosfolípidos no interior da membrana provoca uma alteração na integridade dos *rafts*, sendo este um dos mecanismos propostos para a atividade anti-inflamatória da classe de fosfolípidos PC. Curiosamente, este estudo demonstrou também que quanto maior a insaturação da PC, maior o poder inibitório sobre o NF-κB. Pela observação dos resultados obtidos é possível verificar que a maioria dos fosfolípidos que apresentam alterações significativas possui um elevado número de insaturações, como por exemplo, PC (38:6) e PC (36:3). Assim, a diminuição significativa das espécies moleculares de PC na condição SLE inativo, comparativamente à condição controlo e SLE ativo, pode dever-se ao facto de esta estar a ser utilizada para inibir o NF-κB, diminuindo a sua ação pró-inflamatória.

A LPC é um componente importante do plasma humano, sendo produzida através de secreções hepáticas e pela ação da fosfolipase A₂ ou da lecitina-colesterol aciltransferase sobre a PC. No plasma, a LPC é encontrada sob a forma de uma mistura constituída por diferentes espécies moleculares, entre as quais LPC (16:0) (40 %), LPC (18:2) (20 %) e LPC (18:1), (18:2) (10-15 %) (82). Este facto encontra-se de acordo com os dados obtidos, uma vez que as espécies moleculares referidas são também as mais abundantes nas três condições. Pela análise dos dados, é possível observar uma diminuição significativa das espécies moleculares LPC (16:0) e LPC (18:0) na condição SLE em fase

de remissão (inativo), relativamente ao controlo. Por sua vez, a espécie LPC (18:1) demonstrou um aumento significativo na condição SLE inativo, relativamente ao controlo, e na condição SLE ativo, quando comparado com a condição SLE inativo. A espécie molecular LPC (18:2) verificou um aumento significativo nas condições SLE ativo e SLE inativo, comparativamente ao controlo. Assim, podemos observar uma diferença entre o padrão das espécies moleculares saturadas, que diminuem na SLE inativa, e o das espécies moleculares insaturadas, que aumentam na mesma condição face ao controlo. Okita *et al* (83) verificaram que em condições inflamatórias, as espécies saturadas LPC (16:0) e LPC (18:0) se encontram aumentadas, e as espécies moleculares LPC (18:1) e LPC (18:2) se encontram diminuídas (83). Nos dados obtidos, foi apenas possível verificar uma diminuição da LPC (18:1) e LPC (18:2) na condição SLE inativo, relativamente à SLE ativo, podendo estar associada a uma diminuição dos eventos inflamatórios. Contudo, uma vez que os dados das espécies saturadas, LPC (16:0) e LPC (18:0) não estão de acordo com o postulado, não é possível retirar conclusões quanto ao rácio saturado *versus* insaturado. Comparando a abundância relativa da LPC e da PC, seria de esperar uma diminuição da abundância de PC em detrimento da LPC em cada condição estudada, uma vez que PC é clivada na posição sn2 para dar origem às espécies de LPC pela fosfolipase A₂. Contudo, apenas foi possível relacionar a diminuição da espécie molecular PC (36:3)- (18:1/18:2)- com o aumento das espécies moleculares LPC (18:1) e LPC (18:2) na condição SLE inativo relativamente ao controlo. Na artrite reumatoide, também uma doença auto-imune, verifica-se que as alterações no rácio PC/LPC se relacionam com a ação anti-inflamatória da LPC (84). No entanto, uma vez que este rácio se verifica apenas em duas espécies moleculares de LPC, (18:1) e (18:2), mais uma vez não será possível retirar conclusões precisas quanto à ação anti-inflamatória da LPC.

A classe de fosfolípidos PE é a segunda classe mais abundante das membranas fosfolipídicas, sendo formada a partir do ácido fosfatídico pela adição da etanolamina. Pela análise dos dados, verifica-se um padrão semelhante ao observado para a classe PC, em que ocorrem diminuições significativas na condição SLE inativo, relativamente ao controlo e à condição SLE ativo. Pacientes com SLE em fase de remissão teriam uma menor quantidade de PE no seu conteúdo plasmático. Estudos indicam que o rácio PC/PE em membranas celulares pode estar associado à inflamação (85,86). No entanto, nos nossos dados não foi possível observar uma diminuição do rácio PC/PE, uma vez que o

padrão entre as duas classes é semelhante. De referir, que o único fosfolípido de todas as classes analisadas que apresentou diferenças significativas entre as três condições foi o fosfolípido PE (40:5)- (18:0/22:5). Esta espécie molecular apresenta na sua composição o ácido gordo C22:5, ou seja, o ácido docosapentaenóico derivado de ácidos gordos de ómega-3 (87). Este ácido é um metabolito que resulta da elongação do ácido eicosapentaenóico, dando depois origem ao DHA. Assim, o facto do ácido gordo C22:5 estar diminuído na condição SLE inativo, relativamente ao controlo e SLE ativo, pode indicar que está a ser utilizado para formar o DHA. Este será depois convertido nos mediadores lipídicos anti-inflamatórios, resolvinas e protectinas, permitindo assim atenuar a inflamação, de forma a induzir um fenótipo de SLE mais moderado, o SLE na fase de remissão (78).

3.3. Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram que o padrão de fosfolípidos entre os dois estadios da doença é significativamente diferente, demonstrando, assim, que a fase de remissão e a fase de recaída são marcadas por alterações no perfil lipídico, possivelmente, induzidas pela inflamação. A análise do perfil das classes de fosfolípidos por TLC, demonstrou diferenças significativas entre as condições estudadas nas classes de fosfolípidos PC, LPC e PS. A técnica de GC-MS identificou, por sua vez, algumas diferenças no perfil de ácidos gordos, nomeadamente, no ácido gordo C16:0 e C22:6. A análise estatística multivariada e discriminante dos resultados obtidos por HPLC-MS e MS/MS, permitiu constatar que as classes de fosfolípidos PC, LPC e PE são as classes que mais permitem distinguir entre a condição SLE em fase de remissão e a condição SLE em fase de recaída. Estas diferenças aparentam estar correlacionadas com o estado inflamatório dos pacientes. No caso de indivíduos com SLE em fase de remissão (inativo), estes apresentam um perfil lipídico caracterizado por uma diminuição das classes de fosfolípidos PC, PE e LPC saturadas, relativamente ao controlo. Pacientes com SLE em fase de recaída (ativo) possuem um padrão de fosfolípidos inverso à condição anterior, marcado por um aumento das classes de fosfolípidos PC, PE e LPC saturadas. As duas formas da SLE, ativo e inativo, são, assim, marcadas por alterações no padrão destes fosfolípidos, que possuem um papel relevante no processo inflamatório. Conclui-se, assim, que esta abordagem lipidómica permite distinguir entre a SLE em fase de remissão e SLE em fase de recaída, permitindo ter uma nova visão dos processos fisiopatológicos, caracterizados por alterações a nível do padrão de fosfolípidos. Desta forma, os fosfolípidos poderão ter um

papel não só no diagnóstico atempado da fase de remissão do SLE, mas também na terapêutica. Tal facto poderá ser apenas confirmado após validação dos resultados, utilizando uma amostra de maiores dimensões e fazendo um estudo longitudinal.

Capítulo 4

Avaliação das alterações no perfil lipídico de células de monócitos THP-1 tratadas com LPS e Tunicamicina por espectrometria de massa

4. Avaliação das alterações no perfil lipídico de células de monócitos THP-1 tratadas com LPS e Tunicamicina

Os monócitos desempenham um papel importante no sistema imune inato. Estas células estão envolvidas em processos inflamatórios, tendo como capacidade sintetizar e secretar citocinas pró e anti-inflamatórias. As células THP-1 são uma linha celular de leucemia humana aguda monocítica, que tem sido cada vez mais utilizada como um modelo para estudar a capacidade de resposta imune dos monócitos. Este facto verifica-se devido à semelhança entre a resposta das células de monócitos THP-1 e da fração de monócitos presente nas células mononucleares do sangue periférico. Sendo assim, este modelo de linha celular foi utilizado para avaliar as alterações no perfil lipídico de células tratadas com um indutor de stresse inflamatório, LPS, e um indutor de stresse do retículo endoplasmático, tunicamicina.

4.1. Resultados

4.1.1. Separação das classes de fosfolípidos através de TLC

As alterações no perfil das classes de fosfolípidos de células de monócitos THP-1 sob stresse induzido por LPS e tunicamicina foram analisadas após a separação das classes por TLC. Assim, por TLC fracionaram-se os extratos lípidos das células não tratadas (controlo) (n=3) e das células estimuladas com LPS (n=3) e tunicamicina (n=3), tendo-se identificado cada uma das classes de fosfolípidos por comparação com padrões de fosfolípidos puros aplicados na mesma placa de TLC. Através desta técnica foi possível identificar oito classes de fosfolípidos nas três condições, nomeadamente, lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomiéline (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) e cardiolipina (CL) (**Figura 14**).

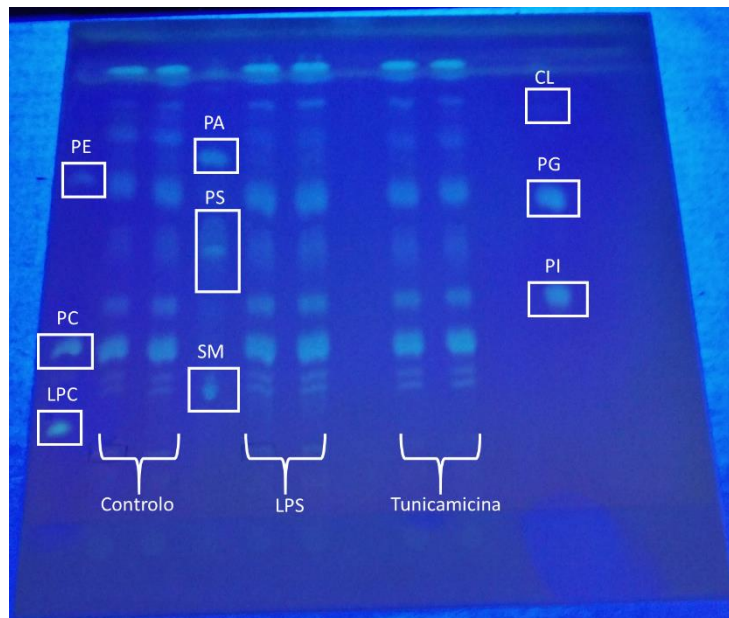


Figura 14- Separação das classes de fosfolípidos das células de monócitos THP-1 não tratadas (controlo) e tratadas com indutores de stresse inflamatório (LPS) e de stresse do retículo endoplasmático (tunicamicina) por TLC. As classes fosfolipídicas foram identificadas pela aplicação de padrões de fosfolípidos puros na mesma placa de TLC.

As classes de fosfolípidos separadas por TLC foram quantificadas através do ensaio espectrofotométrico da quantificação de fósforo. Este ensaio permitiu, assim, determinar a percentagem relativa de cada classe presente nas condições experimentais em estudo (**Figura 15**). Nestas três condições, verificou-se que as classes fosfolipídicas PC, PS, PE e PG foram as classes mais abundantes, sendo a classe LPC a menos abundante nas três condições. A análise estatística demonstrou que existem diferenças significativas nos fosfolípidos PE e PG. No caso da classe PE, observou-se um aumento significativo da sua abundância relativa nas condições de stresse induzido por LPS e tunicamicina relativamente à condição controlo. A PG diminuiu significativamente nas células estimuladas com LPS comparativamente ao controlo.

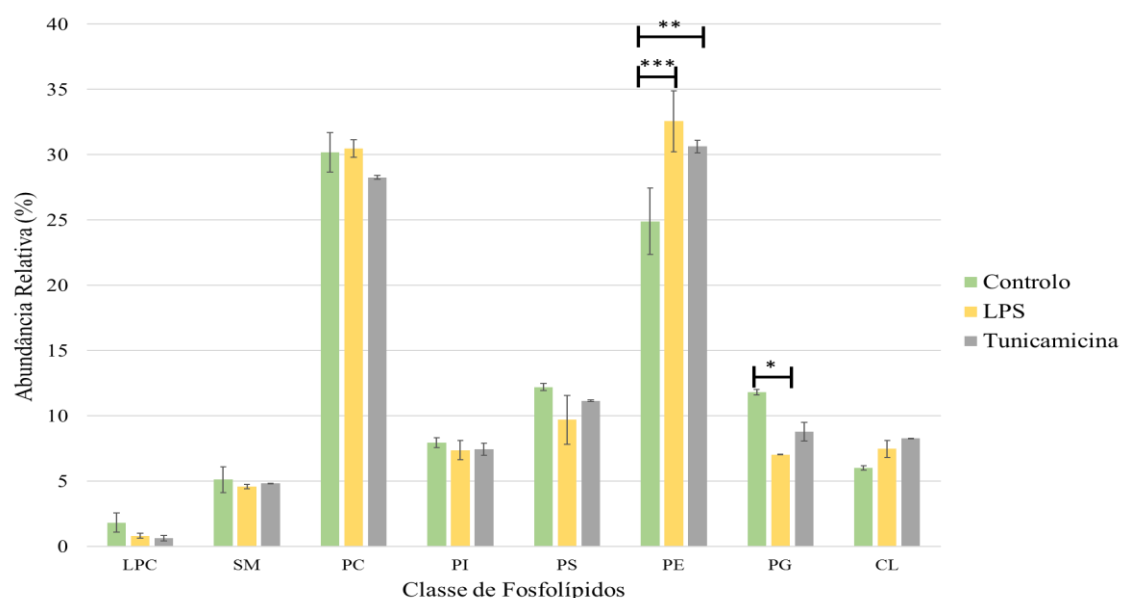


Figura 15- Percentagem relativa das principais classes de fosfolípidos identificadas no extrato lipídico de amostras de células de monócitos THP-1 sem estímulo (controlo) e tratadas com LPS e tunicamicina. As classes de fosfolípidos foram separadas por TLC e a percentagem relativa de cada classe determinada pela quantificação espectrofotométrica de fósforo. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão de três amostras independentes (n=3). * p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001.

4.1.2. Análise do perfil de ácidos gordos por GC-MS

Com o objetivo de avaliar os efeitos da indução de stresse do reticulo induzido pela tunicamicina e do stresse inflamatório induzido pelo LPS no perfil de ácidos gordos, realizou-se uma análise por GC-MS dos ésteres metílicos de ácidos gordos. Os ácidos gordos identificados por GC-MS foram ácido tetradecanóico (C14:0), ácido pentadecanóico (C15:0), ácido hexadecanóico saturado (C16:0) e monoinsaturado cis e trans (16:1), ácido heptanóico (C17:0), ácido octodecanóico saturado (C18:0), monoinsaturado cis e trans (C18:1) e polinsaturado (C18:2, C18:3), ácido eicosanóico polinsaturado (C20:2, C20:3, C20:4) e, por fim, o ácido docosahexanóico (C22:6). A integração dos picos dos cromatogramas de GC-MS permitiu determinar a percentagem relativa de cada ácido gordo, permitindo, assim, identificar as alterações no perfil de ácidos gordos nas condições estudadas (**Figura 16**). Deste modo, foi possível observar um aumento significativo do ácido gordo C16:1-cis nos extratos lipídicos das células tratadas com tunicamicina quando comparado com o controlo. Relativamente aos ácidos gordos C18:0 e C22:6, verificou-se uma diminuição da sua abundância relativa nas condições experimentais estudadas relativamente à condição controlo. Por último, foi possível observar uma diminuição significativa do ácido gordo C20:2 no extrato lipídico de células tratadas com tunicamicina comparativamente às células não tratadas.

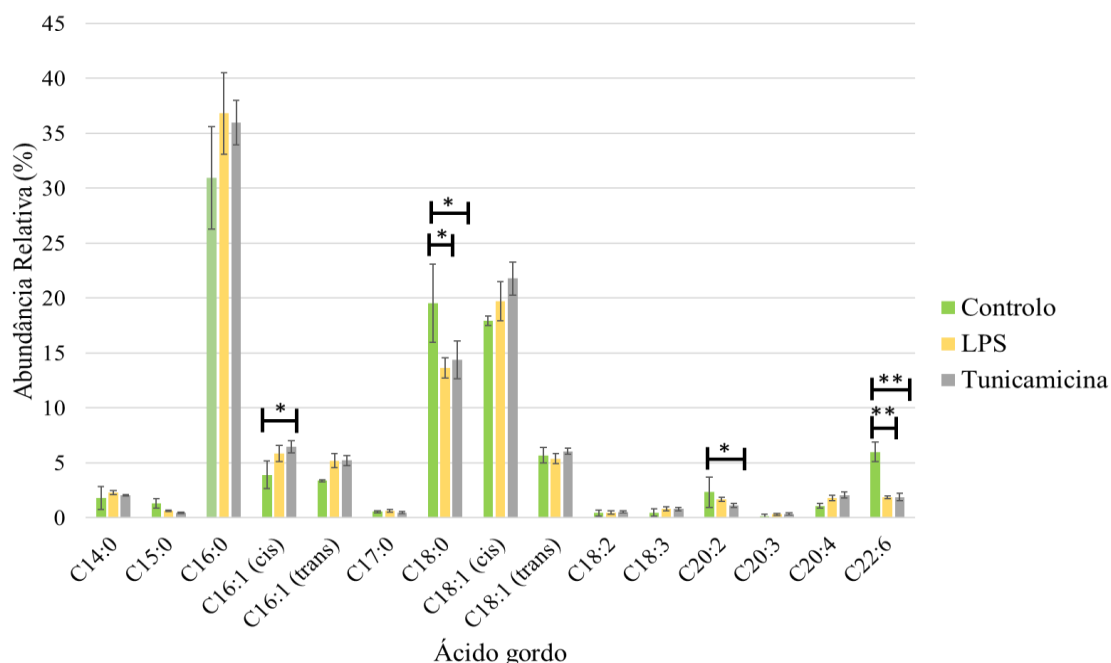


Figura 16- Percentagem relativa de ácidos gordos dos extratos lipídicos das células de monócitos THP-1 não tratadas (controlo) e tratadas com LPS e tunicamicina. O perfil de ácidos gordos foi obtido pela análise dos cromatogramas e espetros de massa de GC-MS. Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão de três amostras independentes (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.3. Análise do perfil das classes de fosfolípidos por HPLC-MS/MS

De modo a obter um estudo mais completo sobre o efeito do stresse inflamatório induzido pelo LPS e do stresse do reticulo endoplasmático induzido pela tunicamicina no perfil lipídico das células de monócitos THP-1, recorreu-se à técnica de HPLC-MS e MS/MS. A análise por HPLC-MS permite simultaneamente o fracionamento de diversas classes de fosfolípidos por HPLC e a análise por MS e MS/MS de cada uma das classes identificadas. Assim, os extratos lipídicos das células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina foram analisados no modo negativo para as classes PC, PS, PI, LPC e PG, e no modo positivo para as classes PC, PE e SM. De uma forma geral, foi possível identificar todas as classes separadas por TLC, com exceção da CL. Os dados foram obtidos, no mínimo, em triplicado para cada condição (n=3), sendo elas, sem tratamento e tratadas com LPS e tunicamicina. Após a análise dos cromatogramas e dos espetros de HPLC-MS, os dados foram processados e integrados no *software* MZmine 2.0. No modo negativo as classes de fosfolípidos mais abundantes nas condições controlo e nas condições experimentais foram PC, PI e PS. No modo positivo, as classes de fosfolípidos mais abundantes foram a classe PC e PE.

Os dados obtidos por HPLC-MS foram submetidos a uma análise estatística no programa IBM SPSS. Primeiramente, realizou-se uma análise MANOVA com recurso ao

teste de Traço de Pillai. Tanto no modo negativo ($F= 23,022$; $p\text{-value}= 0,004$), como no modo positivo ($F= 109,671$; $p\text{-value}=0,000$), os resultados indicaram que as classes de fosfolípidos diferem significativamente entre cada condição estudada. Com o intuito de identificar as condições experimentais onde as classes de fosfolípidos variam quanto à sua abundância, realizou-se o teste ANOVA. Este teste indicou que, no modo negativo, as classes fosfolipídicas que apresentam alterações na sua abundância são as PC, PS e PI. No modo positivo, as classes PC e PE são aquelas que mais contribuem para as diferenças observadas entre as condições controlo e condições experimentais. Na tabela seguinte, é possível observar que as classes fosfolipídicas selecionadas pelo teste ANOVA são aquelas que possuem um maior valor de rácio F e um menor valor de *sigma* (**Tabela 8**). Pela comparação entre os fosfolípidos identificados pelos dois modos é possível verificar que as espécies moleculares PC (30:0), PC (32:0), PC (32:1), PC (34:1), PC (38:3) e PC (38:4) apresentam alterações significativas entre condições, tanto no modo negativo, como no modo positivo.

Tabela 8- Espécies moleculares de fosfolípidos com maiores diferenças significativas entre as condições estudadas, respetivos rácios F e valor de *p-value* obtidos através da análise ANOVA aplicada aos dados obtidos por HPLC-MS/MS no modo negativo e positivo. As espécies moleculares foram identificadas através da massa teórica do *lipid maps*. Designação dos fosfolípidos de acordo com o seu número de carbonos e insaturações (C:N).

Modo	Fosfolípido (C:N)	F	P-value
Negativo	PC (30:0)	776,022	0,000
	PC (32:0)	8,406	0,018
	PC (32:1)	5,682	0,041
	PC (34:1)	8,311	0,019
	PC (36:1)	11,455	0,009
	PC (36:2)	6,435	0,032
	PC (38:3)	7,467	0,024
	PC (38:4)	7,354	0,024
	PC (38:5)	7,501	0,023
	PC (38:6)	7,306	0,025
	PC (42:6)	18,781	0,003
	PI (34:1)	22,889	0,002

	PI (34:2)	26,475	0,001
	PI (36:1)	90,749	0,000
	PI (36:2)	53,227	0,000
	PI (36:3)	88,406	0,000
	PI (36:4)	70,580	0,000
	PI (38:1)	50,669	0,000
	PI (38:2)	115, 709	0,000
	PI (38:3)	197,989	0,000
	PI (38:4)	182,319	0,000
	PI (38:5)	14,961	0,005
	PI (40:3)	33,985	0,001
	PI (40:4)	292,417	0,000
	PI (40:5)	255,813	0,000
	PI (40:6)	126,704	0,000
	PS (36:2)	29,544	0,001
	PS (36:4)	41,756	0,000
	PS (38:2)	8,135	0,020
	PS (38:3)	7,969	0,020
	PS (38:4)	5,537	0,043
Positivo	PC (26:0)	22,161	0,002
	PC (30:0)	20,809	0,002
	PC (30:1)	9,814	0,013
	PC (32:0)	16,644	0,004
	PC (32:1)	9,455	0,014
	PC (34:0)	13,283	0,006
	PC (34:1)	15,856	0,004
	PC (34:2)	8,985	0,016
	PC (36:4)	7,003	0,027
	PC (38:3)	10,095	0,012

	PC (38:4)	5,293	0,047
	PC (40:5)	9,188	0,015
	PC (40:7)	15,752	0,004
	PE (32:1)	30,042	0,001
	PE (36:1)	19,082	0,005

Seguidamente, de modo a identificar as condições em que se verificam as alterações significativas nos fosfolípidos supra representados, realizou-se um teste à posteriori, denominado teste *post-hoc* de Tukey. Este teste permitiu verificar que entre as condições controlo e LPS se verificam alterações significativas nas espécies moleculares de fosfolípidos PC (30:0), PI (36:1), PI (36:2), PI (36:3), PI (36:4), PI (38:1), PI (38:2), PI (38:3), PI (38:4), PI (38:5), PI (40:3), PI (40:4), PI (40:5), PI (40:6), PS (36:2) e, por fim, PS (36:4). Relativamente às células tratadas com tunicamicina, por comparação com o controlo, verificaram-se alterações significativas na abundância relativa das classes de fosfolípidos PC (32:0), PC (32:1), PC (36:2), PC (38:5), PC (38:6), PC (42:6), PI (34:2), PI (36:2), PI (36:5), PI (38:2), PI (38:3), PI (38:5), PI (40:4), PI (40:5), PI (40:6), PI (40:7) e PS (36:3). Nas células tratadas com os dois estímulos estudados, LPS e tunicamicina, observaram-se diferenças significativas nas classes de fosfolípidos PC, nomeadamente, nos fosfolípidos PC (32:1), PC (34:1), PC (38:4), PC (38:5), PC (38:6), PC (38:7), PC (42:6). Para além das alterações observadas na classe fosfolipídica PC, foi também possível observar alterações nas classes PI (34:1), PI (34:2), PI (34:3), PI (36:3), PI (36:4), PI (36:6), PI (38:3), PI (38:4), PI (38:5), PI (38:6), PI (40:5), PI (40:6), PI (40:7), PI (40:8), PS (36:4) e PS (36:5).

No modo positivo, tal como descrito pelo teste ANOVA, observaram-se alterações significativas num menor número de fosfolípidos, quando comparado com o modo negativo. Assim, entre as condições controlo e LPS ficou demonstrada uma alteração no perfil de fosfolípidos PC (26:0), PC (30:0), PC (30:1), PC (32:0), PC (34:2), PC (38:3), PC (40:7) e PE (32:1). Relativamente às células sob stresse induzido pela tunicamicina, verificou-se uma alteração nas espécies moleculares PC (30:1), PC (32:0), PC (32:1), PC (34:0), PE (32:2) e PE (40:4). Por último, analisando as células tratadas com os dois estímulos de stresse, LPS e tunicamicina, verificaram-se variações significativas na classe de fosfolípidos PC, concretamente, nos fosfolípidos PC (26:1), PC (30:1), PC (30:2), PC

(32:1), PC (32:2), PC (34:1), PC (34:2), PC (34:3), PC (36:4), PC (40:8). Além disso, foi também possível observar alterações significativas numa única espécie molecular de PE, a PE (32:3).

De modo a obter uma informação estatística mais completa relativamente aos dados obtidos por HPLC-MS no modo negativo e positivo, realizou-se um outro teste multivariado, denominado teste discriminante de Fisher. O valor obtido para os dois modos, positivo e negativo, analisados foi igual a 0,000. Este teste reproduz os resultados com base nas funções discriminantes. Neste caso, uma vez que temos três condições em estudo, controlo e células tratadas com LPS e tunicamicina, são elaboradas duas funções, função 1 e função 2. No modo negativo, a função 1 permite explicar 68,5 % da variância significativa entre as condições e a função 2 31,5 %. Por sua vez, no modo positivo, a função 1 permite explicar 80,5 % das alterações significativas nas classes de fosfolípidos entre as condições estudadas, e a função 2 permite explicar 19,5 %. Cada uma das funções possui um grupo centróide associado, que se podem definir como o valor da função discriminante obtido através dos valores médios das classes de fosfolípidos de cada condição. Assim, caso se adicionassem novos dados, estes seriam caracterizados como pertencendo a uma determinada condição, dependendo da proximidade do seu valor médio aos valores centróides de cada condição. Analisando os valores dos grupos centróides representas nas tabelas seguintes (**Tabela 9 e tabela 10**), é possível observar que, tanto no modo negativo como no modo positivo, a função 1 permite separar de uma forma muito eficaz as três condições, uma vez que os valores dos grupos centróides se encontram bastante afastados. Relativamente à função 2, esta permite separar entre as condições controlo e as condições experimentais de stresse, mas não permite separa entre as células tratadas com LPS e tunicamicina.

Tabela 9- Grupos centróides das funções discriminantes canónicas formadas através da análise discriminante de Fisher dos dados obtidos por HPLC-MS no modo negativo.

Condição \ Função	Função	
	1	2
Controlo	-3,129	10,022
LPS	-11,226	-6,850
Tunicamicina	14,355	-3,172

Tabela 10- Grupos centróides obtidos pelas funções discriminantes canónicas formadas através da análise discriminante de Fisher dos dados obtidos por HPLC-MS no modo positivo.

Função Condição	1	2
Controlo	-1,026	13,922
LPS	25,041	-6,525
Tunicamicina	-24,015	-7,398

A análise discriminante de Fisher fornece ainda a indicação das classes de fosfolípidos que mais contribuem para a diferença notável entre as três condições e para a discrepância entre os valores dos grupos centróides. Estes fosfolípidos possuem a designação de coeficientes de função de Fisher e são selecionados devido à obtenção de uma pontuação discriminante mais elevada. No modo negativo, as classes de fosfolípidos PC e PI foram as selecionadas como coeficientes de Fisher, nomeadamente, as espécies moleculares PC (32:0), PC (32:1), PC (34:1), PI (36:2) e PI (38:3). Relativamente ao modo positivo, as espécies moleculares que mais contribuem para as diferentes existentes entre as condições são PC (32:0), PC (32:1), PC (34:1), PC (34:2), PC (36:2) e PE (34:1)

A análise estatística PCA foi também realizada para todas as espécies moleculares identificadas no modo negativo para as condições controlo, células sob stresse induzido por LPS e células sob stresse induzido pela tunicamicina. Tal como a análise discriminante de Fisher efetuada, também o PCA permitiu obter uma separação total das condições estudadas (**Figura 17**). Na figura 17 é possível observar que, no modo negativo, as réplicas de cada condição se encontram próximas do seu respetivo centróide, demonstrando, assim, que não existem *outliers* e que as réplicas se encontram bem agrupadas por condição. A função 1, no eixo horizontal, permite essencialmente distinguir entre as células tratadas com LPS e tunicamicina. Relativamente à função 2, representada no eixo vertical, tal como já tinha sido descrito pelo teste estatístico discriminante de Fisher, permite separar de uma forma notória e eficaz entre a condição controlo e as condições LPS e tunicamicina.

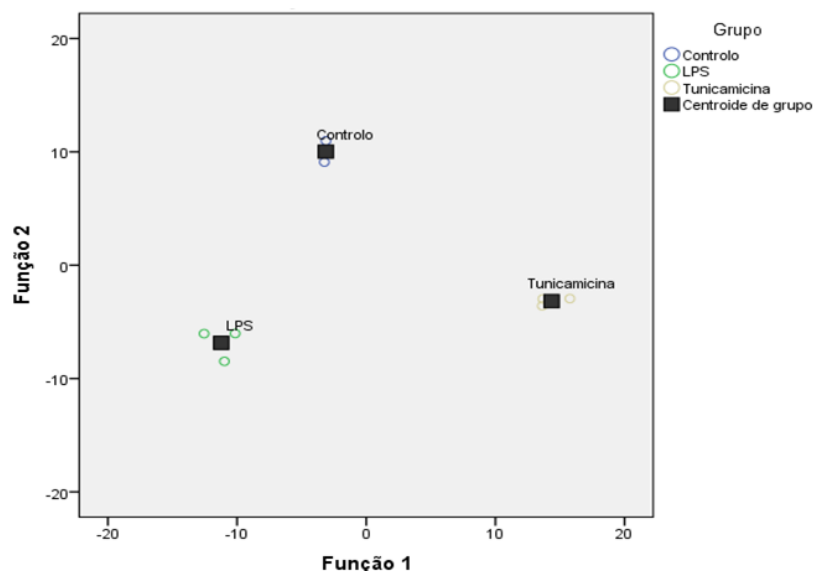


Figura 17- Representação gráfica das pontuações de PCA (componente principal 1 (Função 1) *versus* componente principal 2 (Função 2)) obtidas pela análise multivariada dos extratos lipídicos de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina. Esta representação considera as classes de fosfolípidos identificadas pela técnica de HPLC-MS/MS no modo negativo.

Relativamente ao modo positivo, a análise de PCA foi também utilizada como ferramenta estatística para descrever os resultados obtidos por HPLC-MS. Assim, foi possível verificar que os dados se encontram bem agrupados por condição, não se verificando mais uma vez a existência de *outliers* (**Figura 18**). A representação gráfica confirma, desta forma, a significância dos resultados a nível estatístico, já anteriormente descrita. A função 1 permite, novamente, distinguir de forma clara entre a condição LPS e tunicamicina. Comparativamente ao modo negativo, neste modo verifica-se, no eixo horizontal (função 1), uma troca entre a condição LPS e tunicamicina. Relativamente à função 2 (eixo vertical), esta permite distinguir de forma notória entre as células não tratadas (controlo) e as células tratadas com os indutores de stresse, LPS e tunicamicina.

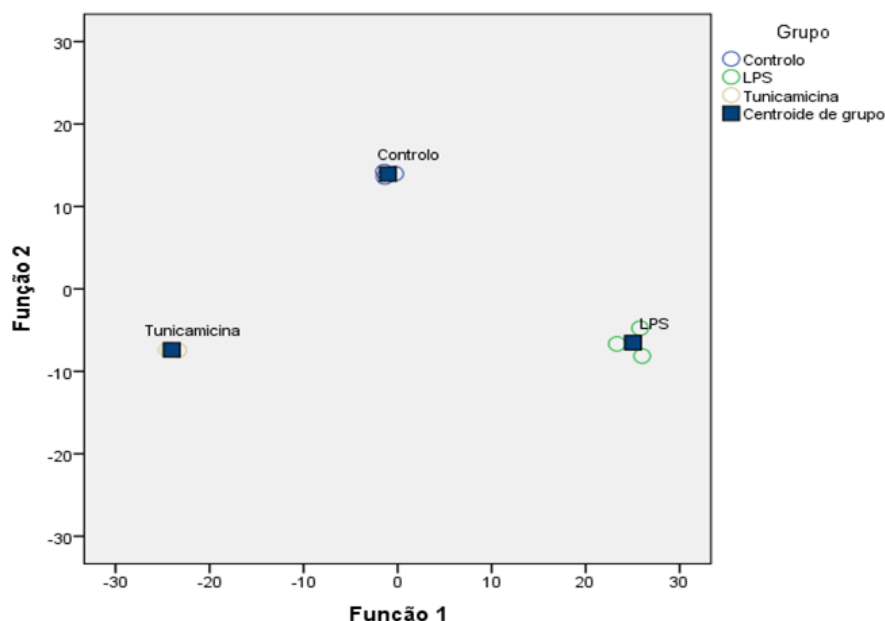


Figura 18- Representação gráfica das pontuações de PCA (componente principal 1 (Função 1) *versus* componente principal 2 (Função 2)) obtidas pela análise multivariada dos extratos lipídicos de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina. Esta representação considera as classes de fosfolípidos identificadas pela técnica de HPLC-MS no modo positivo.

De forma a entender de que modo as classes fosfolipídicas indicadas pelos testes estatísticos variam entre as condições controlo e células tratadas com LPS e tunicamicina, seguidamente será realizada uma descrição e análise individual de cada classe.

A classe de fosfolípidos PC foi analisada no modo negativo como iões $[M+CH_3COO]^-$ e no modo positivo como iões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ (**Tabela 11**). A análise estatística MANOVA, recorrendo ao teste de Traço de Pillai, demonstrou que a abundância relativa desta classe é significativamente diferente entre as três condições, tanto no modo negativo ($F= 461,940$; $p\text{-value}= 0,000$), como no modo positivo ($F= 30,726$; $p\text{-value}= 0,002$). No modo negativo, o teste ANOVA e o teste à posteriori de Tukey demonstraram que a classe PC se altera significativamente entre o controlo e as células tratadas com tunicamicina e entre as células tratadas com LPS e tunicamicina. De uma forma geral, o padrão da variação é igual em todas as espécies moleculares de PC: abundância relativa é maior nas células tratadas com tunicamicina, seguida das células tratadas com LPS e, por fim, das células não tratadas. A PC (32:1) de m/z 790,5622 e a PC (34:1) de m/z 818,5933 são as espécies moleculares mais abundantes nas três condições estudadas (**Figura 19**). Assim, foi possível observar que as espécies moleculares PC (30:0), PC (32:0), PC (32:1), PC (34:1), PC (36:1), PC (38:5), PC (38:6) e PC (42:6) aumentam significativamente nas células tratadas com tunicamicina quando comparadas com as células não tratadas

(controlo). Analisando as células sob stress induzido pelo LPS e pela tunicamicina, verifica-se um aumento significativo das espécies moleculares PC (30:0), PC (32:0), PC (32:1), PC (34:1), PC (36:1), PC (36:2), PC (38:3), PC (38:4), PC (38:5) e PC (42:6) nas células tratadas com tunicamicina.

Tabela 11- Estatística descritiva das espécies moleculares de PC identificadas por HPLC-MS/MS no modo negativo sob a forma de iões $[M+CH_3COO]^-$ e classificadas através do teste ANOVA e *post-hoc* de Tukey.

Fosfolípido (C:N)	<i>m/z</i>	Condição	Área	Desvio padrão
PC (32:1)	790,5622	Controlo	13671,4905	930,1830
		LPS	14209,2780	723,8476
		Tunicamicina	26719,1519	901,5841
PC (34:1)	818,5933	Controlo	12168,1554	814,6906
		LPS	12548,2624	593,1675
		Tunicamicina	26056,1612	390,4054
PC (36:2)	844,6087	Controlo	5208,9440	308,8973
		LPS	4128,5053	84,4162
		Tunicamicina	9605,6352	65,9348
PC (32:0)	776,5822	Controlo	9034,6385	787,8581
		LPS	8423,4154	996,4592
		Tunicamicina	18760,8933	235,3410
PC (38:6)	804,5771	Controlo	2281,3001	563,2571
		LPS	2444,2130	272,3876
		Tunicamicina	4897,9501	359,7874
PC (36:1)	846,6214	Controlo	1614,1354	1029,3722
		LPS	1398,8693	183,1951
		Tunicamicina	3544,8607	63,7426
PC (38:5)	866,5917	Controlo	453,1110	306,8268
		LPS	507,5622	59,0442
		Tunicamicina	989,7713	83,9707
PC (34:3)	814,5621	Controlo	388,3808	210,4834
		LPS	264,3839	33,6489

		Tunicamicina	539,0602	35,7677
PC (38:3)	870,6244	Controlo	175,4772	103,4133
		LPS	118,2978	9,4911
		Tunicamicina	319,9702	47,2969
PC (38:4)	868,6075	Controlo	160,3820	99,9209
		LPS	110,0297	8,9263
		Tunicamicina	289,8520	21,6397
PC (42:6)	860,5997	Controlo	114,8172	32,1326
		LPS	103,2795	3,5379
		Tunicamicina	212,2617	25,9353
PC (30:0)	764,5458	Controlo	71,3008	2,4360
		LPS	165,2957	0,9791
		Tunicamicina	97,9441	4,5084

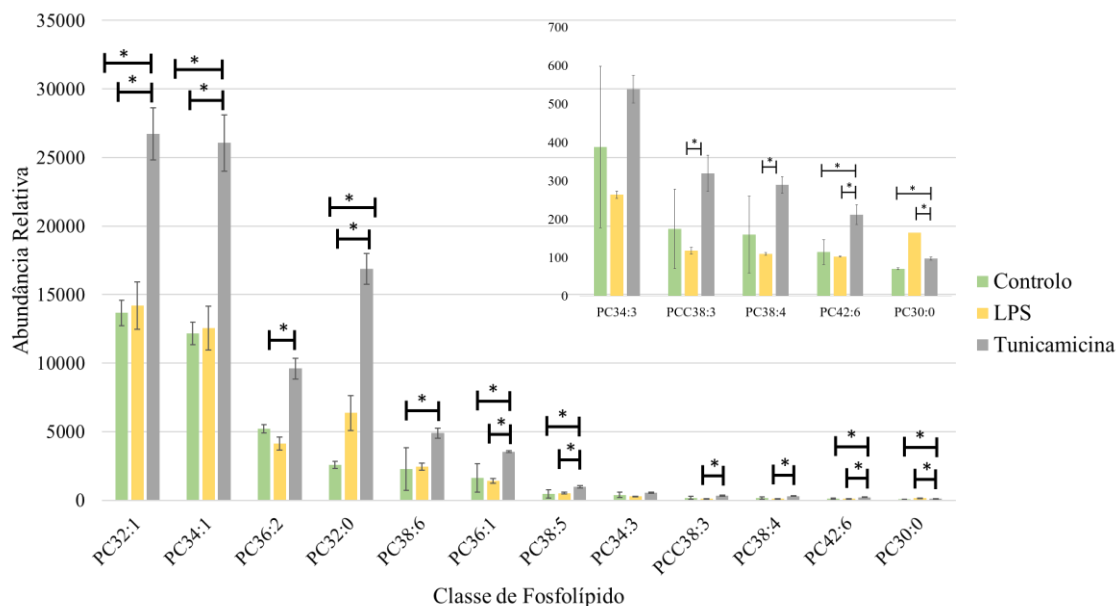


Figura 19- Percentagem relativa de fosfolípidos da classe PC presentes no extrato lipídico de amostras de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina após análise dos espectros de HPLC-MS no modo negativo como iões $[M+CH_3COO]^-$. Identificação das espécies moleculares de PC com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise de estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A análise da classe de fosfolípidos PC obtidos no modo positivo como iões $[M+H]^+$ através dos testes estatísticos ANOVA e *post-hoc* de Tukey revelou alterações significativas entre as três condições estudadas (**Tabela 12**). Assim, analisando as condições controlo e células tratadas com tunicamicina verificou-se um aumento significativo nestas últimas nas espécies moleculares PC (32:0), PC (32:1), PC (34:0) e PC (34:1). Relativamente às células tratadas com LPS, quando comparadas com a condição controlo, foi possível observar um aumento significativo da espécie molecular PC (30:0) e uma diminuição significativa das PC (38:3) e PC (40:7). Relativamente às condições LPS e tunicamicina verificou-se um aumento significativo das espécies moleculares PC (34:1), PC (32:1), PC (34:2), PC (38:3), PC (40:7) e PC (40:5) nas células tratadas com tunicamicina. Além disso, pela análise destas duas condições, foi também possível observar a diminuição significativa da espécie molecular PC (30:0) (**Figura 20**). Assim, foi possível verificar diferenças com significado estatístico em fosfolípidos comuns ao modo negativo e positivo, PC (32:1), PC (34:1) e PC (38:3).

Tabela 12- Estatística descritiva das espécies moleculares de PC identificadas por HPLC-MS/MS no modo positivo sob a forma de iões $[M+H]^+$ e classificadas através do teste ANOVA e *post-hoc* de Tukey.

Fosfolípido (C:N)	<i>m/z</i>	Condição	Área	Desvio padrão
PC (34:1)	760,5851	Controlo	1578,2934	122,2563
		LPS	1528,9846	46,1730
		Tunicamicina	2071,4735	184,3920
PC (32:1)	732,5546	Controlo	1660,0255	158,0606
		LPS	1755,5431	63,1005
		Tunicamicina	2113,4900	159,4707
PC (32:0)	734,5662	Controlo	1167,3220	75,9895
		LPS	1036,0050	29,7053
		Tunicamicina	1412,9927	98,2043
PC (36:2)	786,6006	Controlo	722,0396	87,7949
		LPS	522,1659	7,2061
		Tunicamicina	700,3306	249,5083
PC (34:2)	758,5697	Controlo	663,5174	78,2802
		LPS	522,3351	14,6584

		Tunicamicina	723,2928	65,7548
PC (36:1)	788,6157	Controlo	202,1537	20,9031
		LPS	159,7592	2,3184
		Tunicamicina	250,0998	94,8780
PC (34:0)	762,5926	Controlo	182,8824	18,3681
		LPS	188,3714	7,1107
		Tunicamicina	252,1027	24,8033
PC (36:4)	782,5671	Controlo	154,0221	9,4504
		LPS	141,4935	6,8349
		Tunicamicina	181,2655	19,8836
PC (36:3)	784,5855	Controlo	140,6730	18,6575
		LPS	92,8323	2,3605
		Tunicamicina	131,2003	41,0605
PC (38:5)	808,5824	Controlo	77,3265	4,2887
		LPS	57,4941	0,9714
		Tunicamicina	74,9059	23,0821
PC (36:5)	780,5510	Controlo	57,5079	1,8346
		LPS	45,4501	1,6833
		Tunicamicina	47,9301	22,0459
PC (34:3)	756,5523	Controlo	56,6246	4,9568
		LPS	49,8877	0,9663
		Tunicamicina	57,5199	5,3650
PC (38:4)	810,5963	Controlo	39,2621	3,5621
		LPS	20,7613	8,9216
		Tunicamicina	40,2976	10,6382
PC (30:0)	706,5381	Controlo	38,4778	35,4345
		LPS	152,6338	7,1112
		Tunicamicina	91,7136	10,2475

PC (38:3)	812,6151	Controlo	29,6152	3,4042
		LPS	13,6475	5,3552
		Tunicamicina	28,5819	5,5604
PC (40:7)	832,5851	Controlo	9,5700	1,2995
		LPS	5,4136	0,5127
		Tunicamicina	9,5089	1,1362
PC (28:0)	700,4965	Controlo	8,3595	1,4918
		LPS	9,2353	0,5434
		Tunicamicina	8,8181	0,8521
PC (40:5)	836,6164	Controlo	6,6557	1,4243
		LPS	3,6981	0,7449
		Tunicamicina	7,7647	1,3210
PC (26:0)	650,4777	Controlo	0,7562	0,4632
		LPS	2,3834	0,1655
		Tunicamicina	1,0601	0,2491

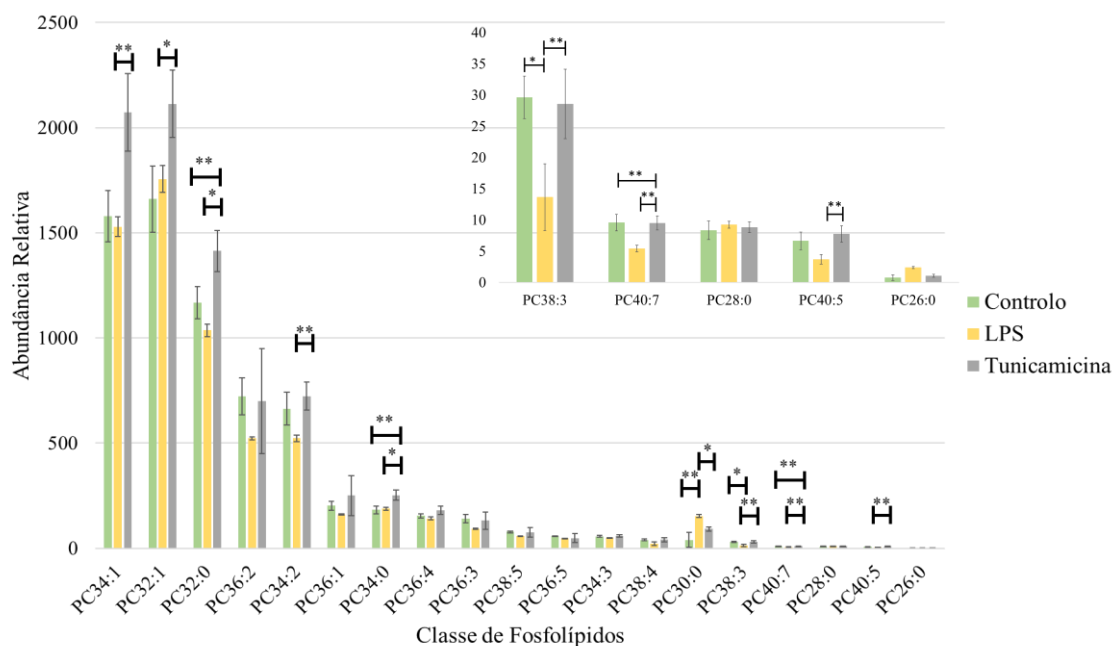


Figura 20- Abundância relativa de fosfolípidos da classe PC presentes no extrato lipídico de amostras de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina após análise dos espectros de HPLC-MS no modo positivo como íões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. Identificação das espécies moleculares de PC com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Através do teste ANOVA e *post-hoc* de Tukey foi possível observar que, no modo negativo, a maioria das espécies moleculares da classe de fosfolípidos PI, identificadas por HPLC-MS, possui variações significativas ($p < 0,05$) entre as condições estudadas (**Tabela 13**). Assim, analisando esta classe individualmente, verificou-se pela análise multivariada MANOVA que o teste de traço de Pillai evidencia alterações claras nas espécies moleculares desta classe ($F = 54,755$, $p\text{-value} = 0,001$). Na figura 21 encontra-se demonstrado que as espécies moleculares PI (36:2) de m/z 861, 5501, PI (38:3) de m/z 887,5663 e PI (38:4) de m/z 885,5499 são as espécies mais abundantes nas três condições (**Figura 21**). As espécies moleculares PI (34:1), PI (34:2), PI (36:1), PI (36:2), PI (36:3), PI (36:4), PI (38:1), PI (38:2), PI (38:3), PI (38:4), PI (40:4), PI (40:5) e PI (40:6) diminuem significativamente entre o controlo e as células sob stresse induzido por LPS. Relativamente às células tratadas com tunicamicina, quando comparadas com o controlo, revelam um aumento significativo das espécies moleculares PI (34:1), PI (36:4), PI (38:1), PI (38:3), PI (38:4), PI (38:5), PI (40:4), PI (40:5) e PI (40:6). Por último, as células tratadas com os dois indutores de stresse em estudo, LPS e tunicamicina, revelaram um aumento significativo nesta última condição, nos fosfolípidos PI (34:2), PI (36:1), PI (36:2), PI (36:3), PI (36:4), PI (38:1), PI (38:2), PI (38:3), PI (38:4), PI (38:5), PI (40:3), PI (40:4), PI (40:5) e PI (40:6).

Tabela 13- Estatística descritiva das espécies moleculares de PI identificadas por HPLC-MS/MS no modo negativo sob a forma de iões $[M-H]^-$ e classificadas através do teste ANOVA e *post-hoc* de Tukey.

Fosfolípido (C:N)	m/z	Condição	Área	Desvio padrão
PI (36:2)	861,5501	Controlo	1713,3653	21,8576
		LPS	1118,6031	116,9145
		Tunicamicina	1902,3523	118,9092
PI (38:3)	887,5663	Controlo	1607,1211	55,2608
		LPS	787,9795	76,4651
		Tunicamicina	1926,4013	82,3040
PI (38:4)	885,5501	Controlo	1401,3890	54,2379
		LPS	705,5551	21,1081
		Tunicamicina	1823,6662	111,1257

PI (34:1)	835,5350	Controlo	1338,6957	53,6970
		LPS	1023,6554	130,6902
		Tunicamicina	1512,5357	64,6847
PI (36:1)	863,5649	Controlo	1102,1134	80,9192
		LPS	706,3484	21,8212
		Tunicamicina	1373,8398	64,4187
PI (38:2)	889,5798	Controlo	631,8838	48,8910
		LPS	329,0756	16,9541
		Tunicamicina	714,6183	22,9473
PI (34:2)	833,5193	Controlo	625,1377	56,9854
		LPS	446,6250	28,0149
		Tunicamicina	689,0712	36,5401
PI (36:3)	859,5334	Controlo	510,7879	29,5438
		LPS	280,8733	7,0026
		Tunicamicina	533,6193	32,6764
PI (38:5)	883,5347	Controlo	290,3420	32,9108
		LPS	250,0000	18,1143
		Tunicamicina	353,4935	15,0227
PI (36:4)	857,5428	Controlo	185,5903	16,1149
		LPS	123,5872	5,0313
		Tunicamicina	237,3093	11,3314
PI (40:5)	911,5654	Controlo	138,3578	7,2630
		LPS	70,1593	3,7269
		Tunicamicina	181,6708	6,6742
PI (40:6)	909,5455	Controlo	98,6737	9,4015
		LPS	50,9740	3,4733
		Tunicamicina	135,6062	5,2372
PI (38:1)	891,5943	Controlo	88,6512	7,0595
		LPS	59,0331	6,1766

		Tunicamicina	106,5106	3,7625
PI (40:4)	913,5809	Controlo	64,1857	2,2672
		LPS	37,8496	2,2807
		Tunicamicina	79,2936	1,7882
PI (40:3)	915,5987	Controlo	39,0822	5,6454
		LPS	22,0206	2,3664
		Tunicamicina	45,3966	1,1201
PI (38:6)	881,5157	Controlo	31,4682	6,2404
		LPS	28,4701	0,6261
		Tunicamicina	35,0737	1,7236
PI (40:2)	917,6128	Controlo	17,8633	3,6348
		LPS	12,9868	1,5258
		Tunicamicina	16,2920	1,8024
PI (40:7)	907,5355	Controlo	7,4205	2,6209
		LPS	7,8897	0,7472
		Tunicamicina	5,4975	1,6880

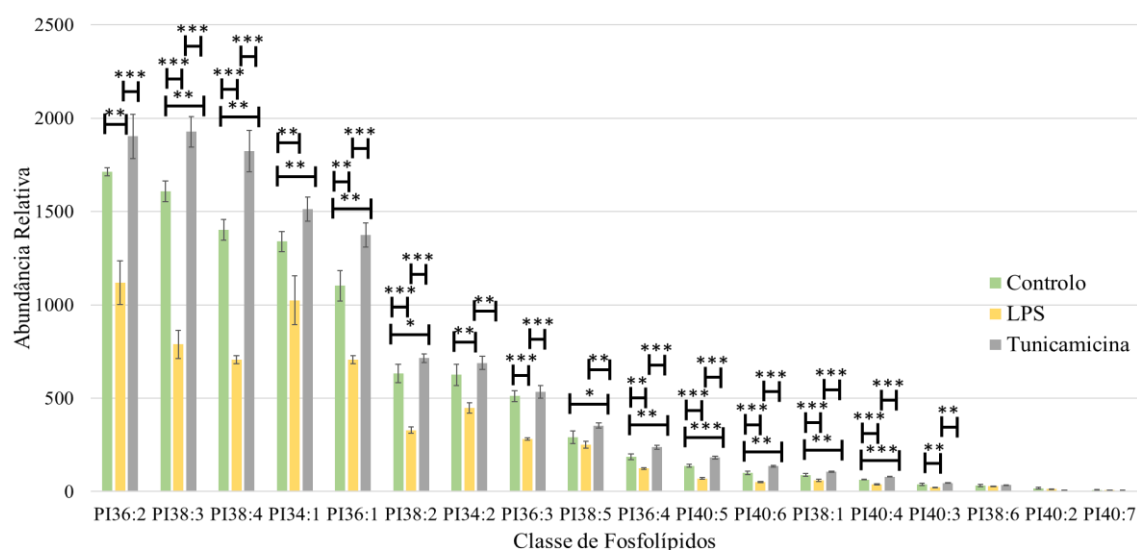


Figura 21- Abundância relativa das espécies moleculares de fosfolípidos da classe PI presentes no extrato lipídico de amostras de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina após análise dos espectros de HPLC-MS no modo negativo como íões $[M-H]^-$. Identificação das espécies moleculares de PI com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A análise dos espectros de massa no modo negativo das amostras de cada uma das condições estudadas permitiu ainda a identificação da classe de fosfolípidos PS. Esta classe foi analisada sob a forma de iões $[M-H]^-$ (**Tabela 14**). A PS (36:1) de m/z 788,5456

A análise dos espectros de massa no modo negativo das amostras de cada uma das condições estudadas permitiu ainda a identificação da classe de fosfolípidos PS. Esta classe foi analisada sob a forma de iões $[M-H]^-$ (**Tabela 14**). A PS (36:1) de m/z 788,5456 foi a espécie molecular mais abundante em todas as condições estudadas (**Figura 22**). A análise estatística ANOVA e *post-hoc* de Tukey permitiu observar a diminuição significativa nas espécies moleculares PS (36:2) e PS (36:4) nas células tratadas com LPS, quando comparadas com células não tratadas. Além disso, verifica-se também um aumento estatisticamente relevante nas células tratadas com o indutor de stresse do reticulo tunicamicina, comparativamente as células tratadas com LPS.

Tabela 14- Estatística descritiva das espécies moleculares de PS identificadas por HPLC-MS/MS no modo negativo sob a forma de iões $[M-H]^-$ e classificadas através do teste ANOVA e *post-hoc* de Tukey.

Fosfolípido (C:N)	m/z	Condição	Área	Desvio padrão
PS (36:1)	788,5456	Controlo	1351,9577	586,8949
		LPS	2247,2437	165,4750
		Tunicamicina	2380,3244	2175,2754
PS (38:8)	802,5611	Controlo	979,8898	664,1179
		LPS	686,3211	395,3007
		Tunicamicina	980,0893	1062,6128
PS (36:2)	786,5298	Controlo	871,3599	146,8139
		LPS	536,3663	37,9030
		Tunicamicina	1223,9526	114,1135
PS (38:2)	814,5614	Controlo	242,2532	103,3469
		LPS	236,3171	147,9057
		Tunicamicina	382,0957	67,2523
PS (34:1)	760,5143	Controlo	245,7170	248,9506
		LPS	163,0858	24,2433
		Tunicamicina	135,2189	75,8454

PS (38:4)	810,5290	Controlo	213,6782	151,4076
		LPS	74,2625	60,9696
		Tunicamicina	337,1801	38,5229
PS (38:3)	812,5454	Controlo	189,5631	65,5289
		LPS	140,5855	7,6102
		Tunicamicina	297,2465	53,8723
PS (36:4)	782,4969	Controlo	142,2495	10,1967
		LPS	79,1053	3,4881
		Tunicamicina	139,4076	12,5703
PS (36:3)	784,5147	Controlo	81,8025	42,6333
		LPS	76,2613	13,4994
		Tunicamicina	136,4035	7,8692
PS (32:1)	732,4834	Controlo	61,7050	49,2101
		LPS	37,6107	7,5157
		Tunicamicina	21,0359	11,1496
PS (34:2)	758,4987	Controlo	50,7367	34,4661
		LPS	19,5888	10,6019
		Tunicamicina	34,1330	2,5749
PS (38:7)	804,5700	Controlo	18,3553	14,5226
		LPS	5,8916	1,8085
		Tunicamicina	19,2653	7,3186
PS (40:7)	832,5146	Controlo	19,8468	5,9308
		LPS	10,5464	1,4091
		Tunicamicina	24,6625	9,0169
PS (38:1)	816,5760	Controlo	14,8708	10,2474
		LPS	6,8827	3,4333
		Tunicamicina	26,3123	12,1563
PS (40:3)	840,5785	Controlo	12,4270	3,3482
		LPS	4,5044	1,2366

		Tunicamicina	10,2373	4,9027
PS (40:2)	842,5929	Controlo	6,9022	4,0781
		LPS	4,8664	3,4275
		Tunicamicina	11,1601	9,9803

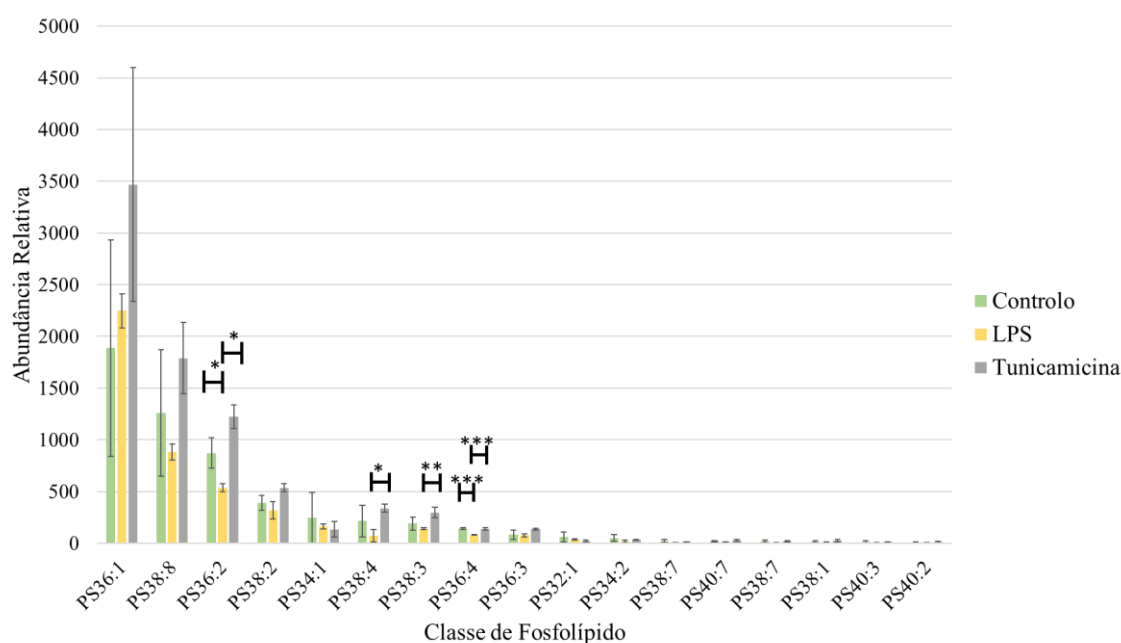


Figura 22- Abundância relativa das espécies moleculares de fosfolípidos da classe PS presentes no extrato lipídico de amostras de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina após análise dos espectros de HPLC-MS no modo negativo como iões $[M-H]^-$. Identificação das espécies moleculares de PS com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A última classe de fosfolípidos que contribui de uma forma estatisticamente significativa para as diferenças entre as condições controlo e experimentais estudadas é a classe fosfolipídica PE (**Tabela 15**). A espécie molecular PE (36:1) de m/z 746.5686 encontra-se em maior quantidade em todas as condições (**Figura 23**). Comparando as condições controlo e células tratadas com tunicamicina, verifica-se um aumento da espécie molecular PE (32:1) e uma diminuição da PE (36:1) nas células tratadas com o indutor de stresse tunicamicina. Analisando as condições controlo e de células sob stresse induzido por LPS verifica-se uma diminuição significativa na espécie molecular PE (32:1). Por último, por comparação entre as células tratadas com os dois indutores de stresse avaliados ao longo deste trabalho, verificou-se um aumento significativo da PE (32:1) e PE (36:1) nas células tratadas com tunicamicina.

Tabela 15- Estatística descritiva das espécies moleculares de PI identificadas por HPLC-MS/MS no modo positivo sob a forma de iões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ e classificadas através do teste ANOVA e *post-hoc* de Tukey.

Fosfolípido (C:N)	<i>m/z</i>	Condição	Área	Desvio padrão
PE (36:1)	768,5530	Controlo	137,3805	4,1363
		LPS	153,0728	6,4277
		Tunicamicina	239,6206	52,7664
PE (34:2)	716,5226	Controlo	76,9035	13,4278
		LPS	52,4277	8,3231
		Tunicamicina	53,8311	9,7272
PE (36:2)	766,5367	Controlo	27,6058	7,3529
		LPS	16,8107	4,2313
		Tunicamicina	20,7100	4,1565
PE (38:3)	770,5682	Controlo	27,0104	16,2613
		LPS	14,2267	1,6220
		Tunicamicina	21,7408	13,6569
PE (40:6)	792,5534	Controlo	26,8094	6,1021
		LPS	18,7954	2,4381
		Tunicamicina	20,2579	2,6628
PE (36:4)	740,5215	Controlo	25,6621	7,4916
		LPS	16,3136	5,2687
		Tunicamicina	14,9303	2,8224
PE (36:3)	764,5227	Controlo	12,6496	2,1128
		LPS	9,5685	2,3884
		Tunicamicina	9,7156	1,3212
PE (40:5)	794,5678	Controlo	14,4196	5,8960
		LPS	9,5301	1,8531
		Tunicamicina	9,7987	1,1902
PE (32:1)	712,4880	Controlo	11,8695	0,6703
		LPS	6,3893	1,0121

		Tunicamicina	9,4413	0,8861
PE (40:4)	796,5820	Controlo	3,3679	1,0603
		LPS	2,3439	0,3658
		Tunicamicina	1,9030	0,0264
PE (28:0)	636,4604	Controlo	0,8817	0,4578
		LPS	0,7694	0,3368
		Tunicamicina	1,3191	0,3336

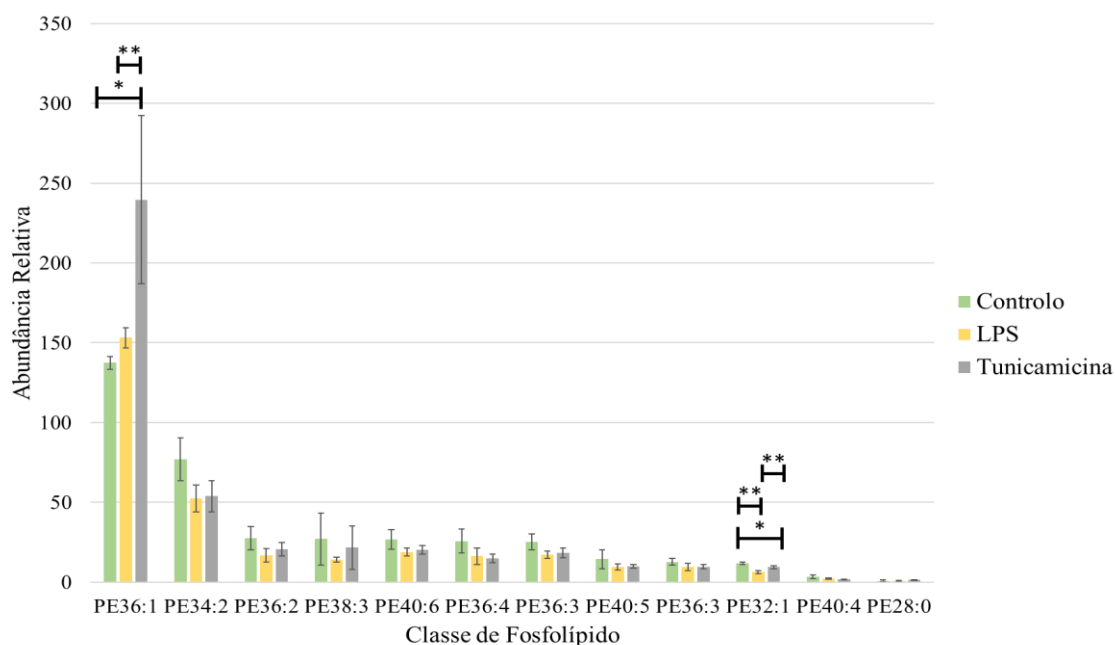


Figura 23- Abundância relativa das espécies moleculares de fosfolípidos da classe PE presentes no extrato lipídico de amostras de células não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina após análise dos espectros de HPLC-MS no modo positivo como iões $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. Identificação das espécies moleculares de PE com a indicação C:N (número de carbonos: insaturações). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão e a sua significância foi obtida através da análise estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.2. Discussão

De modo a comparar as diferenças existentes no perfil lipídico de dois tipos de stresse, nomeadamente, do stresse do retículo endoplasmático e stresse inflamatório, em células de monócitos THP-1, recorreu-se a uma abordagem lipidómica com base nas técnicas de GC-MS e HPLC-MS e MS/MS. Assim, avaliou-se as alterações no perfil de ácidos gordos e de fosfolípidos em células tratadas com tunicamicina, um fármaco indutor do stresse do retículo, e em células tratadas com LPS, um indutor do stresse inflamatório. Pela análise multivariada PCA, foi possível observar que as condições controlos e as duas condições experimentais estudadas são diferentes entre si, demonstrando que os dois indutores

induzem um perfil de fosfolípidos distinto. Assim, pode constatar-se que os dois tipos diferentes de stresse inflamatório se traduzem num perfil de fosfolípidos celulares distintos.

A técnica de GC-MS foi utilizada para estudar o perfil de ácidos gordos de células THP-1 não tratadas e tratadas com LPS e tunicamicina. Deste modo, verificou-se um aumento significativo do ácido gordo C16:1-cis nas células tratadas com tunicamicina, quando comparado com o controlo. Relativamente aos ácidos gordos C18:0 e C22:6, observou-se uma diminuição significativa na condição de LPS e tunicamicina, comparativamente à condição controlo. Por fim, o ácido gordo C20:2 diminui significativamente nas células tratadas com tunicamicina relativamente às células não tratadas. Nas células sob stresse inflamatório e stresse do reticulo endoplasmático verifica-se um aumento dos ácidos gordos saturados e uma diminuição dos ácidos gordos insaturados (43,88,89). De uma forma geral, verifica-se que na condição LPS e tunicamicina existe uma maior abundância relativa de ácidos gordos saturados, comparativamente aos ácidos gordos insaturados, estando estes dados de acordo com a literatura (85–87). O retículo endoplasmático é o organelo responsável pela biogénese das proteínas secretoras e da superfície celular (90). As enzimas do retículo permitem o *folding* das proteínas, levando-as ao seu estado nativo, pelas modificações induzidas por *chaperones* e modificações transducionais. Um processo de *folding* eficiente, requer uma proporção entre o número de proteínas que entram no organelo e a capacidade de *folding* das enzimas do retículo. Quando o número de proteínas excede a capacidade de *folding*, a célula experiencia o stresse do reticulo, que representa uma forma de contrariar a acumulação de proteínas *unfolded*. Assim, face ao stresse do reticulo, verifica-se a ativação da UPR, de modo a restaurar a homeostasia. Snodgrass *et al* (89) demonstraram que o ácido palmítico (C16:0) e a ligação do LPS ao seu recetor, TLR-4, induzem a UPR, induzindo, assim, o stresse do reticulo em células de monócitos THP-1 (89). O stresse do retículo leva, seguidamente, à libertação de citocinas pró-inflamatórias IL1- β . Este grupo de investigação demonstrou também que o DHA (C22:6) inibe o stresse do reticulo induzido pelo ácido palmítico nas células THP-1, inibindo a secreção da IL1- β . Apesar de os nossos resultados não apresentarem uma alteração estatística significativa no perfil de ácidos gordos C16:0, podemos relacionar o seu padrão com o do ácido gordo C22:6. Assim, em condições de stresse verifica-se um aparente aumento do ácido gordo C16:0 e uma diminuição significativa do ácido gordo C22:6. Além disso, o C22:6 é também um

precursor de mediadores lipídicos anti-inflamatórios e a favor da resolução da inflamação. O facto de ocorrer uma diminuição com significado estatístico do C22:6 nas células sob stresse, pode indicar que como forma de adaptação e sobrevivência, as células estão a produzir os mediadores anti-inflamatórios (78). Sendo assim, a diminuição do C22:6 pode estar associada à sua utilização para a produção de mediadores capazes de resolver o processo inflamatório, resolvinas e protectinas.

A classe de fosfolípidos PC foi identificada no modo negativo e positivo. Em ambos os modos verificou-se um perfil lipídico semelhante, marcado por um aumento das espécies moleculares na condição tunicamicina e uma diminuição na condição LPS, relativamente ao controlo. Os fosfolípidos PC (32:1), PC (34:1), PC (38:3) e PC (32:0) apresentaram alterações significativas tanto no modo positivo como no modo negativo. Pela análise dos dados é possível observar que as células tratadas com o indutor de stresse do retículo endoplasmático tunicamicina apresentam um aumento significativo na maioria das espécies moleculares identificadas. O stresse do retículo é caracterizado pela acumulação de proteínas *unfolded* no lúmen, levando à ativação das moléculas sinalizadoras da UPR, as IRE1 (91). Estas ativam o ATF6 α e a PERK. Durante o stresse do retículo, o *folding* eficiente das proteínas e a homeostasia são reestabelecidos através do aumento do volume do retículo endoplasmático, aumento este que ocorre em consequência do aumento da síntese de fosfolípidos (45). Os componentes da maquinaria da biogénese da membrana lipídica são marcados como alvos da UPR. Assim, ocorre a sobre expressão do fator de transcrição XBP1, levando à expansão do retículo endoplasmático através do aumento da síntese de PC via citidina difosfocolina (CDP-colina) (92). Inicialmente, a enzima colina cinase fosforila a colina na presença de ATP, de modo a formar a fosfocolina. Esta é convertida pela colina citidiltransferase (CCT) na CDP-colina. Por último, a colinafosfotransferase 1 (CPT1) transfere a parte de colina da CDP-colina para o diacilglicerol, produzindo a PC. Resumindo, a ativação do XBP1 leva a um aumento da atividade das enzimas CCT e da CPT, induzindo um aumento na síntese de PC, o que está de acordo com o observado nos nossos resultados. Esta ao ser um dos maiores componentes da membrana do retículo endoplasmático, leva à expansão do organelo em questão. Relativamente às células tratadas com LPS, de uma forma geral, verificou-se a diminuição do fosfolípido PC. O LPS liga-se ao seu recetor TLR-4 e induz a libertação de citocinas pró-inflamatórias, como, o TNF- α e IL-6 (93). Jung *et al* (93) verificaram que a adição de PC a células de monócitos inibiu significativamente a

libertação das moléculas pró-inflamatórias em resposta ao LPS. Assim, a diminuição de PC nos nossos resultados, pode estar associada ao facto de as espécies moleculares desta classe estarem a ser utilizadas na inibição da libertação das citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, a diminuição da classe PC pode também estar relacionada com a sua degradação pelas fosfolipases para a produção de eicosanóides e de LPC pró-inflamatórias (94).

A classe de fosfolípidos PI demonstrou ser uma das mais importantes para as diferenças existentes entre as três condições. Pela análise dos resultados, é possível observar alterações significativas entre as três condições na maioria das espécies moleculares identificadas, com exceção das espécies menos abundantes. A PI é sintetizada no retículo endoplasmático a partir da citidina difosfatodiacilglicerol (CDP-DAG) e do inositol, pela ação da CDP-DAG fosfatidilinositol transferase (95). As formas fosforiladas da PI (PIP) são importantes reguladores do transporte de vesículas. Uma alteração no seu metabolismo encontra-se associado a diversos estados de doença. A enzima PI3K catalisa a fosforilação de lípidos inositol da membrana, levando à síntese de fosfoinositol-3,4,5-trifosfato (96). Em casos de stresse do retículo endoplasmático, as subunidades reguladoras p85 α e p85 β da PI3K interagem com o fator de transcrição XBP1, aumentando a sua translocação nuclear, e modulando, assim, a UPR (97). Além disso, a diminuição do p85 α pode modificar a UPR através da diminuição da proteína XBP1, da redução da atividade da IRE1 e via ATF6 α . No caso das células sob stresse do retículo seria de esperar uma diminuição da classe PI, uma vez que segundo a literatura, esta é usada para formar os derivados fosforilados que interagem com a proteína XBP1 (96). Contudo, este aumento pode representar uma adaptação das células para compensar esse gasto, uma vez que a alteração no metabolismo da PI está associado a perda de funções celulares e a diversos estados de patologia. Relativamente à condição LPS, foi possível observar uma diminuição significativa do seu conteúdo de PI, quando comparado com o controlo. O estímulo das células com LPS leva à ativação do complexo CD14-TLR4-MD2 que resulta na expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α (96). Por sua vez, a ativação da via PI3K-Akt nos monócitos THP-1 limita a indução da expressão por parte do LPS das citocinas pró-inflamatórias. Esta limitação é levada a cabo através da inibição dos fatores de transcrição Egr-1, AP-1 e NF- κ B. Assim, a diminuição do conteúdo de PI nas células estimuladas por LPS, pode significar que esta classe está a ser utilizada para produzir os derivados fosforilados que são depois utilizados na via PI3K.

Esta, por sua vez, regula de forma negativa os efeitos induzidos pelo LPS, de forma a promover a sobrevivência celular.

A classe de fosfolípidos PS demonstrou alterações significativas nas espécies moleculares PS (36:2), PS (38:4), PS (38:3) e PS (36:4). Esta classe encontra-se maioritariamente no interior das células, sendo libertada para o exterior em condições específicas. Relativamente à condição LPS, foi possível observar uma diminuição significativa das espécies moleculares referidas, quando comparadas com o controlo. O LPS é um indutor de stresse inflamatório que, através da secreção do TNF- α e da produção de óxido nítrico, leva à apoptose das células (98). A classe de fosfolípidos PS tem sido associada a ações anti-inflamatórias (99). Quando as células experienciam a apoptose, as moléculas de PS passam do interior para o exterior das células, ficando expostas na sua superfície, num processo conhecido como externalização. Esta exposição da PS no folheto externo das células apoptóticas, funciona como um marcador, ativando a fagocitose pelos macrófagos. Assim, a diminuição das espécies moleculares de PS pode estar associada ao facto destes fosfolípidos intervirem na depuração das células apoptóticas, resultantes da indução do LPS. Curiosamente, nas células tratadas com tunicamicina, verifica-se um aumento significativo da classe de PS. Pela informação acima mencionada, seria também de esperar uma diminuição desta classe, uma vez que também o stresse do retículo induz a apoptose. Contudo, uma vez que os mecanismos de indução de apoptose por parte do LPS (27) e da tunicamicina (100) são diferentes e, no último caso ainda não muito conhecidos, a diferença no padrão do fosfolípido PS pode ser explicada pela natureza do estímulo.

A PE apresentou diferenças significativas apenas em duas espécies moleculares. A PE (36:1) é a única espécie molecular que apresenta um aumento significativo na condição tunicamicina face às restantes condições. Apesar de não se terem observado diferenças significativas nas restantes espécies moleculares deste fosfolípido, podemos relacionar de forma inversa o padrão da PS com a PE. No retículo endoplasmático das células ocorre a conversão de PE em PS, através da enzima PSS2 (95). Assim, o facto de observarmos uma diminuição aparente das espécies moleculares de PE, pode dever-se ao facto de estar a ser convertida em PS. Além disso, recentemente foi também identificada uma função da PE associada à autofagia (101). Este processo requer a participação de várias proteínas citosólicas, incluindo a *ubiquitin-like protein* LC3, que é um marcador dos

autofagossomas. A formação de autofagossomas, implica a modificação da proteína LC3 pela ligação da PE. Esta ligação leva ao recrutamento da LC3 para as membranas, que regula a fusão parcial da membrana durante a formação do autofagossoma. Assim, a diminuição da espécie molecular PE (32:1) nas condições tunicamicina e LPS pode indicar que esta está a ser utilizada para os processos de autofagia induzidos pela tunicamicina (102) e pelo LPS (103).

4.3. Conclusão

Neste trabalho foi possível constatar que o perfil lipídico das células de monócitos THP-1 varia de acordo com o tipo de indutor de stresse aplicado, LPS ou tunicamicina. O TLC permitiu observar diferenças significativas nas classes de fosfolípidos PE e PG. As alterações no perfil de ácidos gordos, analisadas por GC-MS, demonstraram que os ácidos gordos C16:1-cis, C18:0, C20:2 e C22:6 apresentam alterações com significado estatístico. Por sua vez, a análise estatística multivariada e discriminante aplicada aos resultados obtidos por HPLC-MS e MS/MS, revelou que existem diferenças significativas nas classes de fosfolípidos PC, PI, PS e PE. Estas classes exercem, assim, um importante contributo para a distinção entre as duas condições de stresse. De um modo geral, as células sob stresse do retículo endoplasmático, induzido pela tunicamicina, apresentam um padrão de fosfolípidos caracterizado por um aumento da classe PC, PI e PS e uma diminuição da classe PE, relativamente ao controlo e à condição LPS. Comparando os dois tipos de stresse, verifica-se que a condição LPS apresenta uma diminuição das classes PC, PI e PS, apresentando um perfil semelhante de PE. Assim, os resultados indicam que o perfil lipídico das células se altera de acordo com o estado inflamatório, sem inflamação ou com inflamação induzida por LPS e tunicamicina, e de acordo com a natureza do estímulo, LPS ou tunicamicina. Os dois estímulos são, assim, marcados por um padrão de fosfolípidos de PC, PI, PS e PE diferente e, uma vez que estes fosfolípidos são relevantes no processo inflamatório, pode afirmar-se que o LPS e a tunicamicina induzem processos inflamatórios distintos. Conclui-se, assim, que a abordagem lipidómica utilizada permite distinguir, através do padrão de fosfolípidos, entre as condições sem stresse e com stresse e entre as duas condições de stresse induzido pela tunicamicina e LPS. Este estudo permitiu também obter uma nova visão dos processos fisiopatológicos associados à inflamação induzida por LPS e tunicamicina. Deste modo, os fosfolípidos representam um candidato adequado para o diagnóstico do estado de stresse inflamatório, presente em varias condições de patologia.

Capítulo 5

Conclusão e Perspetivas Futuras

5. Conclusão e Perspetivas Futuras

A inflamação é um processo biológico necessário para manter a homeostasia e permitir a recuperação de uma lesão nos tecidos. Cada vez mais, a inflamação tem sido associada a processos fisiopatológicos, sendo um dos principais fatores associados à morbilidade e mortalidade das patologias. A melhor compreensão do papel da inflamação nas doenças crónicas e autoimunes, permite um tratamento mais adequado para a prevenção e mitigação dos efeitos do processo inflamatório. De acordo com os objetivos propostos neste trabalho, foi possível verificar que no modelo *in vivo*, no lúpus eritematoso sistémico, o perfil lipídico se altera de acordo com o estado de inflamação, ativo ou inativo. Assim, é possível associar cada uma das fases, remissão ou recaída, a uma alteração do perfil lipídico induzida pela inflamação. Os resultados obtidos permitiram verificar diferenças significativas nas classes de fosfolípidos PC, PE e LPC no extrato lipídico do plasma, sendo estas as classes que diferem significativamente de acordo com a alteração no processo inflamatório, ou seja, ativo (SLE em fase de recaída) ou inativo (SLE em fase de remissão). Relativamente ao modelo *in vitro*, baseado em células de monócitos THP-1, foi possível observar diferenças significativas no padrão de fosfolípidos, de acordo com a natureza do estímulo de stresse, LPS ou tunicamicina, e de acordo com a ausência ou presença de stresse. Deste modo, verificou-se que os dois estímulos apresentam um processo inflamatório distinto, uma vez que o padrão de fosfolípidos se altera consoante o estímulo. As classes de fosfolípidos PC, PI, PS e PE são as classes em que se verificaram alterações significativas consoante o indutor de stresse.

As classes de fosfolípidos PC e PE apresentaram alterações estatisticamente relevantes nos dois estádios do SLE e nas células de monócitos THP-1 tratadas com LPS e tunicamicina. Conclui-se, assim, que estas classes desempenham um papel fundamental no processo inflamatório, permitindo a adaptação perante os estímulos. A abordagem lipidómica utilizada neste trabalho demonstrou ser eficiente na análise e identificação das classes de fosfolípidos de cada uma das condições estudadas, permitindo, em ambos os estudos, diferenciar entre cada uma das condições. Assim, o estudo lipidómico utilizado permitiu uma melhor compreensão dos processos fisiopatológicos, envolvidos em diferentes condições de stresse. Esse conhecimento pode ser utilizado, por exemplo, para um melhor diagnóstico e tratamento, permitindo atuar atempadamente na fase de

remissão do SLE ou para distinguir formas de stresse inflamatório presentes em várias patologias.

Futuramente será interessante validar os resultados, relativamente ao modelo *in vivo*, de modo a confirmar o papel dos fosfolípidos como forma de diagnóstico e tratamento para cada um dos estadios da SLE. Esta validação será levada a cabo através da análise de um maior número de amostras não identificadas, preferencialmente em estudos longitudinais, de modo a verificar se existe separação entre as duas fases da doença, induzida pela alteração no padrão de fosfolípidos. No caso do modelo *in vitro*, uma vez que este representa uma forma controlada de estudar o stresse inflamatório presente em várias patologias, seria relevante realizar uma abordagem proteómica. Esta abordagem iria permitir identificar as vias de síntese dos fosfolípidos e uma melhor compreensão da sua modelação em resposta ao stresse e do seu contexto molecular envolvido no processo inflamatório.

Capítulo 6

Referências

6. Referências

- 1.Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*. 2003; 2(3): 119–125.
- 2.Anaya J-M, Gómez L, Castiblanco J. Is there a Common Genetic Basis for Autoimmune Diseases? *Clinical and Developmental Immunology*. 2006; 13(2–4): 95-185.
- 3.Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell*. 1996; 85(3): 311–318.
- 4.Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Rheumatology*. 1993; 32(10): 903–907.
- 5.Morel L, Blenman KR, Croker BP, Wakeland EK. The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, Sle1, is a cluster of functionally related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001; 98(4): 1787–1792.
- 6.Feero WG, Guttmacher AE, Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *New England Journal of Medicine*. 2011; 365(17): 1612–1623.
- 7.Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nature immunology*. 2001; 2(9): 777–780.
- 8.Maidhof W, Hilas O. Lupus: an overview of the disease and management options. *Pharmacy and Therapeutics*. 2012; 37(4): 240-246.
- 9.Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, Ward MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: Estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis & Rheumatism*. 2007; 56(6): 4-2092.
- 10.Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Seminars Arthritis Rheumatism*. 2010; 39(4): 68-257.
- 11.Benseler SM, Silverman ED. Systemic Lupus Erythematosus. *Pediatric Clinics of North America*. 2005; 52(2): 67-443.
- 12.Kyttaris VC, Juang Y-T, Tsokos GC. Immune cells and cytokines in systemic lupus erythematosus: an update. *Current Opinion in Rheumatology*. 2005; 17(5): 22-518.
- 13.Perl A. Pathogenesis and spectrum of autoimmunity. *Methods in Molecular Biology*. 2012; 900: 1–9.
- 14.Bertsias G, Cervera R, Boumpas DT. Systemic lupus erythematosus: pathogenesis and clinical features. *EULAR textbook on rheumatic diseases*, Geneva, Switzerland: European League Against Rheumatism. 2012; 476–505.
- 15.Jensen MA, Patterson KC, Kumar AA, Kumabe M, Franek BS, Niewold TB. Functional genetic polymorphisms in ILT3 are associated with decreased surface

expression on dendritic cells and increased serum cytokines in lupus patients. *Arthritis research & therapy*. 2012; 14(3): 596-601.

16.Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Iaccarino L, Doria A. Environment and systemic lupus erythematosus: an overview. *Autoimmunity*. 2005; 38(7): 72-465.

17.Rahman A. Autoantibodies, lupus and the science of sabotage. *Rheumatology Oxford England*. 2004; 43(11): 36-1326.

18.Rahman A, Isenberg DA. Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine*. 2008; 358(2): 39-929.

19.Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology*. 2007; 46(7): 6-1052.

20.Selmi C. Autoimmunity in 2014. *Clinical Reviews Allergy Immunology*. 2015; 49(2): 9-93.

21.Das UN. Lipoxins as biomarkers of lupus and other inflammatory conditions. *Lipids Health Disease*. 2011; 10: 76.

22.Roman MJ, Shanker B-A, Davis A, Lockshin MD, Sammaritano L, Simantov R. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *New England Journal Medicine*. 2003; 349(25): 406-2399.

23.Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF. Guide to primary prevention of cardiovascular diseases. A statement for healthcare professionals from the Task Force on Risk Reduction. American Heart Association Science Advisory and Coordinating Committee. *Circulation*. 1997; 95(9): 31-2329.

24.Kobayashi K. Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. *Journal Lipid Research*. 2003; 44(4): 26-716.

25.Khovidhunkit W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *Journal of Infectious Diseases*. 2000; 181 Suppl 3: S72-462.

26.Svenungsson E, Gunnarsson I, Fei G-Z, Lundberg IE, Klareskog L, Frostegård J. Elevated triglycerides and low levels of high-density lipoprotein as markers of disease activity in association with up-regulation of the tumor necrosis factor alpha/tumor necrosis factor receptor system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatology*. 2003; 48(9): 40-2533.

27.Gangemi S, Pescara L, D'Urbano E, Basile G, Nicita-Mauro V, Davì G. Aging is characterized by a profound reduction in anti-inflammatory lipoxin A4 levels. *Experimental Gerontology*. 2005; 40(7): 4-612.

28.Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*. 2012; 221(1): 2-11.

29.Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013; 1833(12): 70-3460.

- 30.Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annual Review Biochemistry*. 2005; 74: 89-739.
- 31.Fribley A, Zhang K, Kaufman RJ. Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Molecular Biology*. 2009; 559: 191–204.
- 32.Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports*. 2006; 7(9): 5-880.
- 33.Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*. 2011; 333(6051): 4-1891.
- 34.Shamu CE, Walter P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO Journal*. 1996; 15(12): 39-3028.
- 35.Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012; 13(2): 89-102.
- 36.Vekich JA, Belmont PJ, Thuerlauf DJ, Glembotski CC. Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death. *Journal Molecular Cell Cardiology*. 2012; 53(2): 67-259.
- 37.Cullinan SB, Diehl JA. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *Journal Biology Chemistry*. 2004; 279(19): 17-20108.
- 38.Martinon F, Chen X, Lee A-H, Glimcher LH. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nature Immunology*. 2010; 11(5): 8-411.
- 39.Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? *Trends Molecular Medicine*. 2012; 18(10): 98-589.
- 40.Kaser A, Lee A-H, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. 2008; 134(5): 56-743.
- 41.Proud CG, Colthurst DR, Ferrari S, Pinna LA. The substrate specificity of protein kinases which phosphorylate the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *European Journal Biochemistry FEBS*. 1991; 195(3): 9-771.
- 42.Basseri S, Austin RC. Endoplasmic Reticulum Stress and Lipid Metabolism: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Biochemistry Research International*. 2012; 1–13.
- 86.Huang S, Rutkowsky JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *Journal Lipid Research*. 2012; 53(9): 13-2002.

- 44.Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*. 2011; 473(7348): 31-528.
- 45.Bernales S, McDonald KL, Walter P. Autophagy Counterbalances Endoplasmic Reticulum Expansion during the Unfolded Protein Response. Ploegh H, editor. *Plos Biology*. 2006; 4(12): e423.
- 46.Rosenfeld Y, Shai Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2006; 1758(9): 22-1513.
- 47.Morris MC, Gilliam EA, Li L. Innate Immune Programing by Endotoxin and Its Pathological Consequences. *Frontiers Immunology*. 2014; 5: 680.
- 48.Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiology*. 2000; 8(9): 10-402.
- 49.Park BS, Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental Molecular Medicine*. 2013; 45(12): e66.
- 50.Janssens S, Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Molecular Cell*. 2003; 11(2): 293–302.
- 51.Watanabe S, Kumazawa Y, Inoue J. Liposomal Lipopolysaccharide Initiates TRIF-Dependent Signaling Pathway Independent of CD14. Hoshino Y, editor. *Plos one*. 2013; 8(4): e60078.
- 52.Vartanian KB, Stevens SL, Marsh BJ, Williams-Karnesky R, Lessov NS, Stenzel-Poore MP. LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury. *Journal of Neuroinflammation*. 2011; 8(1):140.
- 53.Brandt EB, Gibson AM, Bass S, Rydyznski C, Khurana Hershey GK. Exacerbation of Allergen-Induced Eczema in TLR4- and TRIF-Deficient Mice. *Journal Immunology*. 2013; 191(7): 25-3519.
- 54.Lowell CA. Src-family and Syk kinases in activating and inhibitory pathways in innate immune cells: signaling cross talk. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*. 2011; 3(3).
- 55.Medina EA, Morris IR, Berton MT. Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation Attenuates the TLR2-Mediated Macrophage Proinflammatory Cytokine Response to *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain. *Journal Immunology*. 2010; 185(12): 72-7562.
- 56.Chaurasia B, Mauer J, Koch L, Goldau J, Kock A-S, Bruning JC. Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 Provides Negative Feedback Inhibition to Toll-Like Receptor-Mediated NF- B Activation in Macrophages. *Molecular Cell Biology*. 2010; 30(17): 66-4354.

57. Gustin JA, Korgaonkar CK, Pincheira R, Li Q, Donner DB. Akt Regulates Basal and Induced Processing of NF- κ B (p100) to p52. *Journal Biology Chemistry*. 2006; 281(24): 81-16473.
58. Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nature Immunology*. 2005; 6(8): 84-777.
59. Escribá PV, González-Ros JM, Goñi FM, Kinnunen PKJ, Vigh L, Sánchez-Magraner L. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *Journal Cell Molecular Medicine*. 2008; 12(3): 75-829.
60. Santinha DR, Marques DR, Maciel EA, Simões CSO, Rosa S, Neves BM. Profiling changes triggered during maturation of dendritic cells: a lipidomic approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012; 403(2): 71-457.
61. Santinha DR, Luísa Dória M, Neves BM, Maciel EA, Martins J, Helguero L. Prospective phospholipid markers for skin sensitization prediction in keratinocytes: A phospholipidomic approach. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2013; 533(1–2): 33–41.
62. Dória ML, Cotrim CZ, Simões C, Macedo B, Domingues P, Domingues MR. Lipidomic analysis of phospholipids from human mammary epithelial and breast cancer cell lines. *Journal of Cellular Physiology*. 2013; 228(2): 68-457.
63. Watson AD. Thematic review series: Systems Biology Approaches to Metabolic and Cardiovascular Disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *The Journal of Lipid Research*. 2006; 47(10): 11-2101.
64. Armstrong D, editor. *Lipidomics*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. 164-171.
65. Milne S, Ivanova P, Forrester J, Alex Brown H. Lipidomics: An analysis of cellular lipids by ESI-MS. *Methods*. 2006; 39(2): 92–103.
66. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total phospholipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*. 1959; 37(8): 7-911.
67. Masoodi M, Nicolaou A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006; 20(20): 9-3023.
68. Christie WW. Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids*. 1998; 33(4): 343–353.
69. Cajka T, Fiehn O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014; 61: 192–206.
70. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheumatology*. 1992; 35(6): 40-630.

71. Bartlett EM, Lewis DH. Spectrophotometric determination of phosphate esters in the presence and absence of orthophosphate. *Analytical biochemistry*. 1970; 36(1): 159–167.
72. International Union of Pure and Applied Chemistry, Commission on Oils F and D, Paquot C, Hautfenne A, International Union of Pure and Applied Chemistry, Commission on Oils F and D. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. Oxford: Blackwell Scientific; 1987.
73. <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=39469>.
74. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC bioinformatics*. 2010; 11(1): 1.
75. Elkan A-C, Anania C, Gustafsson T, Jogestrand T, Hafstrom I, Frostegard J. Diet and fatty acid pattern among patients with SLE: associations with disease activity, blood lipids and atherosclerosis. *Lupus*. 2012; 21(13): 11-1405.
76. Jump DB. The Biochemistry of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal Biology Chemistry*. 2002; 277(11): 8-8755.
77. Rustan AC, Dreven CA. Fatty Acids: Structures and Properties. In: John Wiley & Sons, Ltd, editor. *Encyclopedia of Life Sciences*; 2005.
78. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014; 510(7503): 92–101.
79. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger K. H. Molecular Circuits of Resolution: Formation and Actions of Resolvins and Protectins. *Journal Immunology*. 2005; 174(7): 55-4345.
80. Treede I, Braun A, Jeliaskova P, Giese T, Füllekrug J, Griffiths G. TNF- α -induced up-regulation of pro-inflammatory cytokines is reduced by phosphatidylcholine in intestinal epithelial cells. *BMC Gastroenterology*. 2009; 9: 53.
81. Legler DF, Micheau O, Doucey M-A, Tschopp J, Bron C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation. *Immunity*. 2003; 18(5): 655–664.
82. Ojala PJ, Hirvonen TE, Hermansson M, Somerharju P, Parkkinen J. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on human neutrophils. *Journal Leukocyte Biology*. 2007; 82(6): 9-1501.
83. Okita M, Gaudette DC, Mills GB, Holub BJ. Elevated levels and altered fatty acid composition of plasma lysophosphatidylcholine(lysoPC) in ovarian cancer patients. *International Journal Cancer*. 1997; 71(1): 4-31.
84. Fuchs B, Schiller J, Wagner U, Häntzschel H, Arnold K. The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: Investigations by ³¹P NMR and MALDI-TOF MS. *Clinical Biochemistry*. 2005; 38(10): 33-925.

- 85.Kmieć Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Advances Anatomy Embryology Cell Biology*. 2001; 161: 3–13.
- 86.Li Z, Agellon LB, Allen TM, Umeda M, Jewell L, Mason A. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metabolism*. 2006; 3(5): 31-321.
- 87.Kaur G, Cameron-Smith D, Garg M, Sinclair AJ. Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. *Progress Lipid Research*. 2011; 50(1): 28–34.
- 88.Leamy AK, Egnatchik RA, Shiota M, Ivanova PT, Myers DS, Brown HA. Enhanced synthesis of saturated phospholipids is associated with ER stress and lipotoxicity in palmitate treated hepatic cells. *Journal Lipid Research*. 2014; 55(7): 88-1478.
- 89.Snodgrass RG, Huang S, Namgaladze D, Jandali O, Shao T, Sama S. Docosahexaenoic acid and palmitic acid reciprocally modulate monocyte activation in part through endoplasmic reticulum stress. *Journal Nutritional Biochemistry*. 2016; 32: 39–45.
- 90.Chambers JE, Marciniak SJ. Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 2. Protein misfolding and ER stress. *American Physiological Society Cell Physiology*. 2014; 307(8): 70-657.
- 91.Ron D, Hubbard SR. How IRE1 Reacts to ER Stress. *Cell*. 2008; 132(1): 6-24.
- 92.Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *Journal Cell Biology*. 2004; 167(1): 35–41.
- 93.Jung YY, Nam Y, Park YS, Lee HS, Hong SA, Kim BK. Protective Effect of Phosphatidylcholine on Lipopolysaccharide-Induced Acute Inflammation in Multiple Organ Injury. *Korean Journal Physiology Pharmacology*. 2013; 17(3): 209.
- 94.Funk CD. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science*. 2001; 294(5548): 5-1871.
- 95.Castro-Gómez P, Garcia-Serrano A, Visioli F, Fontecha J. Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*. 2015; 101: 41–51.
- 96.Guha M. The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Limits Lipopolysaccharide Activation of Signaling Pathways and Expression of Inflammatory Mediators in Human Monocytic Cells. *Journal Biology Chemistry*. 2002; 277(35): 32-32124.
- 97.Park SW, Zhou Y, Lee J, Lu A, Sun C, Chung J. The regulatory subunits of PI3K, p85 α and p85 β , interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nature Medicine*. 2010; 16(4): 37-429.
- 98.Xaus J, Comalada M, Villedor AF, Lloberas J, López-Soriano F, Argilés JM. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood*. 2000; 95(12): 31-3823.

- 99.Krahling S, Callahan MK, Williamson P, Schlegel RA. Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differentiation*. 1999; 6(2): 9-183.
- 100.Lim EJ, Heo J, Kim Y-H. Tunicamycin promotes apoptosis in leukemia cells through ROS generation and downregulation of survivin expression. *Apoptosis*. 2015; 20(8): 98-1087.
- 101.Nebauer R, Rosenberger S, Daum G. Phosphatidylethanolamine, a limiting factor of autophagy in yeast strains bearing a defect in the carboxypeptidase Y pathway of vacuolar targeting. *Journal Biology Chemistry*. 2007; 282(23): 43-16736.
- 102.Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochemical Science*. 2015; 40(3): 8-141.
- 103.Yuan H, Perry CN, Huang C, Iwai-Kanai E, Carreira RS, Glembotski CC. LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection. *Heart Circulatory Physiology*. 2008; 296(2): 9-470.